

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Markéta Svojanovská

**Neurobehaviorální následky experimentální psychózy u laboratorních
potkanů**

**Neurobehavioral consequences of experimental psychosis in
laboratory rats**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Aleš Stuchlík, Ph.D.

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Na měřeních bioanalytickými metodami a jejich statistickém vyhodnocení se podíleli také Mgr. Grigorij Tsenov, PhD. a Mgr. Libor Uttl, s behaviorálním měřením pomáhala stážistka Hilal Sengul, MSc., a se statistickým zpracováním behaviorálních dat RNDr. Jan Svoboda, PhD. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27. 4. 2017

Markéta Svojanovská

Poděkování

Předně bych zde chtěla poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Aleši Stuchlíkovi, Ph.D., za veškerou pomoc, ochotu vždy poradit, velké množství času a cenné rady, které mi při psaní této práce poskytl.

Další poděkování patří především RNDr. Janu Svobodovi, Ph.D., za obětavou pomoc při statistickém zpracování dat z behaviorálních testů a Mgr. Liboru Uttlovi společně s Mgr. Grygorijem Tsenovem, Ph.D., za odborný dozor nad Western bloty, jak nad experimentální, tak statistickou částí. Rovněž děkuji kolegyni Hilal Sengul, MSc. za přispění k behaviorálním pokusům.

Dále děkuji všem kolegům z Oddělení neurofyzologie paměti Fyziologického ústavu AV ČR, kteří mi pomohli ke zdárnému dokončení mé práce.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své mamince za možnost studovat na vysoké škole a za její podporu během celé doby mého studia.

Tato práce byla podpořena grantem GAČR 17-04047S a projektem AZV 17-30833A. Institucionální podpora byla poskytnuta projektem RVO:67985823.

Abstrakt

Schizofrenie je závažná duševní porucha, jejíž celoživotní prevalence je kolem 1% a charakteristické je pro ni zhoršení téměř všech psychických funkcí. Její příznaky dělíme na pozitivní, negativní a kognitivní deficit. Psychóza, která také provází schizofrenní onemocnění, je velmi vážným problémem, ovlivňujícím spolu se všemi symptomy jak klinický stav pacientů, tak jejich celkový život. Proto je velká pozornost věnována animálním modelům, které napodobují příznaky této psychózy u zvířat a mohou tak pomoci v osvětlení neurobiologie schizofrenie a v hledání nových antipsychotik.

Tato práce se zaměřila na dvoutýdenní subchronickou aplikaci dizocilpinu (MK-801), non-kompetitivního antagonisty NMDA receptorů, potkanům kmene Wistar a Long-Evans, a to ve dvou věkových skupinách od začátku aplikace látky – ve věku PND 30 a PND 60. Po odeznění akutních účinků MK-801 byly studovány neurobehaviorální následky této experimentální psychózy - pomocí testování potkanů v behaviorálních úlohách, a to ve vyvýšeném křížovém bludišti (EPM), v Morrisově vodním bludišti (MWM) a v úloze aktivního vyhýbání se místu na rotující aréně (kolotočovém bludišti). Nakonec byly pomocí Western blotů zhodnoceny změny v expresi NR1, NR2A a NR2B podjednotek glutamátového NMDA receptoru v hipokampu potkanů.

Bylo zjištěno, že subchronická aplikace MK-801 od PND 30 u potkanů kmene Long-Evans navodila úzkostné chování v EPM a u skupiny s počátkem aplikace v PND 60 zhoršila pracovní paměť a navigaci v MWM. Zhoršení prostorové navigace bylo spojeno se sníženou expresí NR1 a NR2B podjednotky NMDA receptorů v hipokampu. Podobné účinky MK-801 nebyly pozorovány u potkanů kmene Wistar. Z výsledků získaných v této práci lze vyvodit, že MK-801 je schopen navodit některé dlouhodobé změny jak v chování, tak v expresi podjednotek NMDA receptorů a to především u kmene Long-Evans, a aplikace MK-801 tomuto kmeni od věku PND 60 představuje slibnou variantu animálního modelu, která zasluhuje další zkoumání.

Klíčová slova: schizofrenie, animální model, dizocilpin, potkan, chronická aplikace, Western bloty, chování

Abstract

Schizophrenia is a serious neuropsychiatric disease with a lifetime prevalence of 1% and it disrupts almost all mental functions. It manifests with many symptoms, which can be roughly classified into three main classes – positive, negative and cognitive dysfunctions. The psychosis, which can be often seen in schizophrenia, is a very serious problem that along with all other symptoms influences the patients' clinical status as well as quality of their life. As no direct causes or causal treatments for schizophrenia are known, scientist often focus on animal models of schizophrenia as tools for investigating mechanisms that can take a part in real disease and for seeking novel antipsychotics.

This thesis aims at investigating two-week subchronic treatment with dizocilpine (MK-801), a non-competitive antagonist of NMDA receptors, in Wistar and Long-Evans rats aged 30 (PND 30) and 60 days (PND 60) at the onset of the treatment. Subsequently, long-term neurobehavioral consequences of this experimental psychosis were studied by testing rats at three behavioral tasks: the Elevated-plus maze (EPM), the Morris water maze (MWM) and active place avoidance on a rotating arena (Carousel). The Western blot method was used to determine *post-mortem* changes in expression of the NR1, NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor in the hippocampus.

Results have shown that the subchronic MK-801 treatment caused increased anxiety in Long-Evans rats with application starting on PND 30. Moreover, working memory in the MWM was impaired in Long-Evans rats with application starting on PND 60. Impairment in spatial navigation was linked to decreased NR1 and NR2B subunit expression in the hippocampus. No similar effects were observed in Wistar rats. Therefore, the results gained from this thesis suggest that the MK-801 is able to induce long-term behavioral changes as well as changes in the expression of the subunits of the NMDA receptors, especially in the Long-Evans rats. It can be concluded that Long-Evans rats with treatment started on PND 60 represent a suitable variant of this model, which deserves future testing.

Keywords: schizophrenia, animal model, dizocilpine, rats, chronic treatment, Western blot, behavior

Obsah

Seznam zkratk.....	1
Úvod.....	2
1. Schizofrenie.....	4
1.1. Kognitivní deficit u schizofrenie a jejích animálních modelů.....	5
1.2. Teorie vzniku schizofrenie	6
2. Glutamát a jeho receptory	8
2.1. Metabotropní glutamátové receptory	8
2.2. Ionotropní glutamátové receptory	9
2.2.1. AMPA receptory	10
2.2.2. Kainátové receptory.....	10
2.2.3. NMDA receptory.....	10
2.2.3.1. NMDA receptory a jejich vztah ke schizofrenii	12
3. Animální modely schizofrenie	13
3.1. Farmakologické animální modely	14
3.2. Genetické animální modely	17
3.3. Neurovývojové animální modely	18
3.3.1. Animální modely psychózy založené na neurovývojových manipulacích v glutamátergním systému.....	19
4. Testování behaviorálních poruch v animálních modelech psychózy	21
4.1. Vyvýšené křížové bludiště	22
4.2. Morrisovo vodní bludiště	23
4.3. Aktivní vyhýbání se místu s přeučením na rotující aréně	24
4.4. Experimentální psychóza navozená antagonisty NMDA receptorů.....	25
4.4.1. Akutní aplikace antagonistů NMDA receptorů	26
4.4.2. Chronická aplikace antagonistů NMDA receptorů	27
5. Cíle diplomové práce.....	30
6. Materiál a metody.....	31
6.1. Zvířata	31
6.2. Chemikálie.....	31
6.3. Design experimentu.....	31

6.4.	Behaviorální testování	33
6.4.1.	Vyvýšené křížové bludiště	33
6.4.2.	DMP verze Morrisova vodního bludiště	33
6.4.3.	Aktivní vyhýbání se místu s přeučněním na rotující aréně.....	34
6.5.	Biochemická analýza – Western blot	36
6.6.	Statistická analýza	37
6.6.1.	Analýza behaviorálních parametrů.....	37
6.6.2.	Analýza biochemických parametrů	38
7.	Výsledky.....	39
7.1.	Obecná pozorování ve vztahu k aplikaci MK-801	39
7.1.1.	Akutní účinky	39
7.1.2.	Dlouhodobé kvalitativní účinky	39
7.2.	Behaviorální data.....	40
7.2.1.	Vyvýšené křížové bludiště	40
7.2.2.	Morrisovo vodní bludiště	42
7.2.3.	Aktivní vyhýbání se místu s přeučněním na rotující aréně.....	43
7.3.	Analýza změn v hladinách exprese podjednotek NMDA receptorů	46
8.	Diskuze.....	49
9.	Závěr.....	53
10.	Seznam literatury.....	54

Seznam zkratk

5-HT1A, 5-HT2A	Podtypy serotoninových receptorů
ADHD	Hyperaktivita s poruchou pozornosti (<i>Attention Deficit Hyperactivity Disorder</i>)
CNS	Centrální nervová soustava
D2 receptory	Podtyp dopaminových receptorů
DISC1	Disrupted-in-schizophrenia 1
DMP	Delayed-matching-to place verze Morrisova vodního bludiště
DMT	N,N-dimethyltryptamin
EPM	Vyvýšené křížové bludiště (<i>Elevated Plus Maze</i>)
GABA	Kyselina gama-aminomáselná
GAD67	glutamátdekarboxyláza isoforma 67
iGluRs	Ionotropní glutamátové receptory
ITI	Inter-trial interval
LSD	Diethylamid kyseliny lysergové
MAM	Metylazoxymetanol acetát
mGluRs	Metabotropní glutamátové receptory
MK-801	Dizocilpin
MWM	Morrisovo vodní bludiště (<i>Morris Water Maze</i>)
NMDA receptory	N-methyl-D-aspartátové receptory
NRG1	Neuregulin 1
PCP	Fencyklidin (<i>phencyclidine</i>)
PFC	Prefrontální kortex
PND	Postnatální den
PPI	Prepulzní inhibice

Úvod

Experimentální psychóza, k jejímuž navození je v této diplomové práci použit non-kompetitivní antagonist NMDA receptorů dizocilpin (MK-801) je kromě dalších příznaků průvodním jevem schizofrenního onemocnění, kterým trpí každý stý člověk na světě. Na tuto nemoc v současné době neexistuje žádná 100% účinná či dokonce příčinná léčba, a i původ jejího vzniku je nejasný. K osvětlení neurobiologie a k vývoji nových účinnějších léků na schizofrenii se využívá animálních modelů a látek, které ovlivňují neuropřenašečové systémy našeho mozku (především dopaminergní, GABAergní, serotonergní a glutamatergní systém).

Tato práce se zaměřila na narušenou roli glutamatergního systému u schizofrenie z neurovývojového hlediska, především na hypofunkci NMDA receptorů, a to na základě hypotézy, že deficity v jejich funkci mají kritický význam v patofyziologii schizofrenie. K blokádě NMDA receptorů pro vyvolání modelů se nejčastěji využívá jejich non-kompetitivních antagonistů – MK-801, ketaminu a fencyklidinu, kteří u lidských pacientů navozují široké spektrum psychotických příznaků, jako jsou halucinace, deficity v prostorové a pracovní paměti, sociální stažení a kognitivní deficity.

Časná postnatální inhibice NMDA receptorů je model schizofrenní psychózy založený na neurovývojové hypotéze o původu onemocnění. Tato hypotéza říká, že narušení vývoje mozku v jeho rané fázi může potenciálně ovlivnit chemicky komunikující neuronové sítě a následně chování v pozdějším věku. Bylo zjištěno, že i mírné narušení funkcí NMDA receptorů v kritické periodě kortikálního vývoje je rozhodující pro další rozvinutí psychózy, která se často projeví až v dospělosti. Chronická aplikace antagonistů NMDA receptorů vyvolává řadu behaviorálních a morfologických změn odrážejících schizofrenní psychotické chování, a je užitečným modelem pro další studium této problematiky, jelikož navozené neurobehaviorální změny jsou přítomny i po ukončení podávání těchto látek, což naznačuje, že došlo k trvalé změně struktury mozku a organizace během jeho vývoje.

Tato diplomová práce se bude zabývat dvoutýdenní subchronickou aplikací MK-801 potkanům dvou kmenů – Wistar a Long-Evans, kteří jsou dále rozděleni do dvou věkových kohort – první, které se aplikuje MK-801 od 30. postnatálního dne (PND 30) a druhé od PND 60. Třicetidenní potkany lze považovat za adolescentní, zatímco věk šedesáti dnů odpovídá časně dospělosti. Následně bude zkoumán vliv MK-801 na jejich chování - anxieta, učení a kognitivní koordinaci a behaviorální flexibilitu (behaviorální testování ve vyvýšeném křížovém bludišti, Morrisově vodním bludišti a v úloze aktivního se vyhýbání místu na rotující aréně) a dále vliv této látky na změny v expresi podjednotek NMDA receptorů (konkrétně NR1, NR2A a NR2B) v hipokampu. Nakonec práce vyhodnotí, zdali tato manipulace představuje možný animální model schizofrenii-podobného chování.

Literární přehled

1. Schizofrenie

Schizofrenie je vážné neuropsychiatrické onemocnění, charakterizované poruchami vnímání, emocí, motivace, a také učení a paměti. Tyto problémy se začínají objevovat během pozdní adolescence či o něco později a přetrvávají po celý život (Weinberger, 1996). Schizofrenie je jednou z hlavních příčin chronických postižení a invalidity, trpí jí 1% populace na celém světě (Sartorius et al., 1986). Etiologie této nemoci stále ještě není objasněna. Na jejím vzniku se podílí řada faktorů, jak genetických (Kendler et al., 1985), tak environmentálních a sociálních (Mallett et al., 2002). V některých případech může být rizikovým faktorem pro propuknutí schizofrenie prenatální nedostatek nutrientů (Susser et al., 1996), prenatální expozice stresu (van Os a Selten, 1998), či vystavení se chřipce během šestého měsíce těhotenství (Takei et al., 1996).

Příznaky schizofrenie se tradičně rozdělují do tří kategorií: na pozitivní a negativní a na kognitivní deficit. Pozitivní symptomy zahrnují halucinace, bludy a bizarní chování jako např. hyperaktivita a agitace. Do negativních příznaků řadíme poruchy v sociálních interakcích, v motivaci, emoční oploštění, sociální stažení, či sníženou pozornost (Andreasen a Olsen, 1982). Kognitivní deficit se částečně překrývá s pozitivními i negativními příznaky, ale řadíme ho do samostatné kategorie symptomů. Je charakterizovaný problémy s učením, pracovní a dlouhodobou pamětí (Taylor a Abrams, 1984), dále zahrnuje narušení pozornosti, exekutivních funkcí a koncentrace. Exekutivní funkce odráží schopnosti lidí řešit problémy, rozhodovat se, nebo plánovat. Proto je jejich narušení a kognitivní deficit tak významným prvkem této nemoci, který má velký vliv na sociální funkce pacientů ve společnosti a na všechny aspekty jejich každodenního života. Některé studie také podporují názor, že kognitivní zhoršení je asociováno s negativními symptomy nemoci (Gold et al., 1999).

První léky, používané k farmakologické léčbě psychotických symptomů schizofrenie, vznikly kolem roku 1950 a jsou známy jako antipsychotika první generace neboli antipsychotika klasická. Patří mezi ně např. haloperidol a chlorpromazin a jsou klasifikovány dle své chemické struktury. Antipsychotika atypická, tzv. antipsychotika druhé generace, se charakterizují v závislosti na své farmakologii. Byly vyvíjeny od roku 1970, mají jiný klinický profil a menší tendenci k vyvolávání nežádoucích vedlejších účinků. Patří mezi ně klopazin, olanzapin, risperidon či ziprasidon (Jones et al., 2011). Přestože jsou antipsychotika účinná v mírnění psychotických symptomů, stále mají významné nedostatky. Pro zhruba 30% pacientů jsou tyto léky neúčinné, a u 5-10% působí nepříjemné vedlejší účinky, ať už neurologické, gastrointestinální či kardiovaskulární. Mezi neurologické vedlejší účinky patří extrapyramidové příznaky, tedy příznaky podobající se Parkinsonově nemoci, jako je třes, rigidita, a bradykineze nebo akineze (du Bois a Huang, 2007). Data ukázala, že jenom 51,8% pacientů se schizofrenií se po propuknutí psychotické ataky do jednoho roku zcela zotaví (Tohen et al., 1992).

1.1. Kognitivní deficit u schizofrenie a jejích animálních modelů

Deficit v kognitivních schopnostech je považován za endofenotyp schizofrenie. Je přítomen jak u pacientů již před prvním atakem psychózy, tak u jejich nejbližších příbuzných – lidí s vysokým rizikem pro psychózu (Bora a Murray, 2014). Bylo zjištěno, že děti, kterým byla v pozdějším věku diagnostikována psychóza a kognitivní zhoršení, už dlouho předtím vykazovaly dysfunkce v neuromotorickém vývoji (Walker et al., 1994) a v sociálním vývoji a interakcích (Done et al., 1994).

První významnější metaanalýza kognitivního deficitu, která naznačila jeho důležitost u schizofrenního onemocnění, se uskutečnila v letech 1980-1997. Obsahuje více než 200 studií a popisuje rozdíly mezi zdravými kontrolními skupinami a schizofreniky ve verbální a neverbální paměti, v motorických úlohách, prostorové paměti, zrakové pozornosti či exekutivních funkcích. Všechny tyto schopnosti jsou u schizofrenních pacientů na rozdíl od zdravých jedinců signifikantně zhoršené (Heinrichs a Zakzanis, 1998).

Fakt, že čím je kognitivní deficit u pacientů vážnější, tím horší jsou jejich výsledky v sociálním a pracovním životě, vedl Národní ústav duševního zdraví v USA k založení Výzkumu měření a léčení za účelem zlepšení kognice u schizofrenie (*MATRICES: Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia*). Cílem tohoto výzkumu je vývoj farmakologických přípravků pro zlepšení kognitivních schopností u schizofrenie. Badatelé rovněž vytvořili Standardní baterii testů pro vyšetření kognitivního deficitu, které hodnotí sedm klíčových kognitivních funkcí pro schizofrenii: rychlost zpracování informací, pozornost, pracovní paměť, verbální a vizuální učení, řešení problémů a sociální kognici (Marder a Fenton, 2004).

Kognitivní porucha u schizofrenie je velmi rozšířená, téměř univerzální a vyskytuje se u více než 70% pacientů (Palmer et al., 1997). Přesto dochází v průběhu onemocnění k jejímu vývoji a změnám. Stirling s kolegy sledoval průběh kognitivního zhoršení u 49 pacientů v průběhu deseti let po první psychotické atace. Zjistili, že některé kognitivní schopnosti mohou být v době nástupu psychózy stejné jako u zdravých jedinců a zhoršit se až v průběhu onemocnění, a naopak jiné mohou být zhoršeny na začátku nemoci a časem se postupně zlepšovat (Stirling et al., 2003). Zlepšení kognitivních schopností bylo také pozorováno po propuštění pacientů z nemocnice, a to především v oblasti paměti a pozornosti (Nemoto et al., 2014). Proto je správně nastavená lékařská péče velice důležitá, nicméně by se neměly podceňovat vedlejší účinky farmakoterapie na pacienty. V průběhu léčby klopazinem však bylo pozorováno zlepšení kognitivních schopností (Hagger et al., 1993), a po dalších typech antipsychotické léčby bylo prokázáno zlepšení kognice, exekutivních funkcí, pozornosti a verbální i neverbální paměti (Gold et al., 1999). Další možností, jak zabránit zhoršování kognitivních schopností je kombinace psychiatrické rehabilitace a kognitivní remediac, což je soubor postupů pro zlepšování kognitivních funkcí (McGurk et al., 2007). Bylo zjištěno, že kognitivní remediac mimo jiné podporuje neuroplasticitu v některých oblastech mozku (Penadés et al., 2013).

Pro kognitivní funkce jsou také nezbytné správně vyvinuté a funkční neuronové sítě, které zahrnují především prefrontální kortex (PFC) a jeho projekce do ostatních oblastí mozku. Jejich změny mohou ke kognitivnímu zhoršení přispívat také (Sakurai et al., 2015). Metaanalýza neurozobrazovacích studií Minzenberga a kolegů ukázala u schizofrenních pacientů sníženou aktivitu v dorsolaterálním prefrontálním kortexu, anteriorním cingulárním kortexu a mediodorsálních jádrech talamu během exekutivních úkolů, jako např. Stroop test (Minzenberg et al., 2009). Jedna experimentální studie na zvířatech také ukázala důležitost prefrontálního kortexu jako regionu zodpovědného za expresi schizofrenii-podobných příznaků - hyperlokomoce a stereotypního chování (Takahata a Moghaddam, 2003). Také morfologické změny hipokampu, části limbického systému, který má významnou roli při krátkodobém uchovávání informací a prostorové orientaci, mohou mít význam v kognitivním deficitu (Small et al., 2011). V subgranulární zóně *gyrus dentatus* v hipokampu probíhá neurogeneze - tvorba nových neuronů, a to nejen v prenatálním období, ale i v dospělosti (Cameron a Gould, 1994). Na základě experimentálních studií byl navržen názor, že snížená neurogeneze v dospělosti může mít také významný vliv na patofyziologii schizofrenie (Reif et al., 2006).

1.2. Teorie vzniku schizofrenie

Příčina a mechanismus vzniku schizofrenie stále není zřejmá, a neustále se objevují nové teorie. Nejstarší je dopaminergní hypotéza vzniku schizofrenie, kterou prvně navrhl vědec Arvid Carlsson, nositel Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu. Tato původní hypotéza tvrdí, že zvýšený dopaminergní přenos, a látky, které ho způsobují, jsou zodpovědné za pozitivní příznaky schizofrenie (Carlsson a Lindqvist, 1963). Během let však došlo k mírné úpravě původní hypotézy, a dnes se soudí, že negativní příznaky souvisí se sníženou aktivitou dopaminových receptorů v PFC, a naopak pozitivní příznaky s hyperaktivitou dopaminových receptorů v mesolimbickém systému (Marcotte et al., 2001). Všechna klasická antipsychotika jsou antagonisté dopaminových D2 receptorů a existuje vysoká míra korelace mezi klinickou účinností antipsychotik a jejich účinností blokovat dopaminové receptory (Seeman a Lee, 1975). Dále pro tuto teorii svědčí fakt, že aplikace amfetaminu zdravým jedincům u nich vyvolá psychotické symptomy, které kopírují schizofrenní příznaky (Angrist a Gershon, 1970), a pacientům se schizofrenií jejich symptomy ještě zhoršuje (Snyder, 1976). V *post-mortem* tkáni mozku pacientů se schizofrenií byla také zjištěna vyšší denzita D2 receptorů (Wong et al., 1986).

Vůbec první farmakologické modely schizofrenie byly založeny na účinku LSD a jiných halucinogenních drog. Vědělo se, že tyto látky působí jako antagonisté serotoninových receptorů (Gaddum a Hameed, 1954). Poruchy v serotonergním systému tvoří druhou teorii vzniku schizofrenie. Jejím základem bylo zjištění změněné exprese serotoninových 5-HT1A a 5-HT2A receptorů u

schizofrenních pacientů, kdy je počet 5-HT_{1A} receptorů v prefrontálním kortexu zvýšený, a naopak exprese 5-HT_{2A} receptorů je snížena (Burnet et al., 1996). Dále tuto teorii podporuje fakt, že atypická antipsychotika, jako je klopazin, mají také vysokou afinitu k serotoninovým 5-HT_{2A} receptorům (Arranz et al., 1998). I přes důkaz změn v serotonergní transmissi u schizofrenie je však stále velice málo důkazů pro primární dysfunkci serotonergního systému u této nemoci. Kromě toho opakované podávání LSD vede spíše k behaviorální toleranci než ke zvyšování odpovědi (Braff a Geyer, 1980).

Třetí teorií vzniku schizofrenie je GABAergní. Tento model byl vytvořen na základě změn v GABAergním systému, které byly pozorovány jak v klinických studiích, tak v animálních modelech. Byla zjištěna snížená hustota GABAergních neuronů, abnormality v jejich receptorech a ve vychytávání neurotransmiteru (Wassef et al., 2003), dále pokles aktivity enzymu GAD65/67 (glutamát-dekarboxyláza) a snížená exprese její mRNA v PFC (Volk et al., 2000). Selektivní změny v genové expresi GABA neuronů v PFC mohou také zhoršovat kognitivní funkce u schizofrenie (Hashimoto et al., 2003). Oproti zdravým jedincům mají dále pacienti se schizofrenií významný deficit v densitě GABAergních parvalbumin-(PV+)-imunoreaktivních neuronů v hipokampu. Tento deficit je výraznější u mužské části nemocných a nezávisí na antipsychotické léčbě, věku pacientů nebo délce trvání nemoci (Zhang a Reynolds, 2002). U animálních studií vyvolává aplikace pikrotoxinu (nekompetitivního antagonisty GABA-A receptorů) do PFC deficit v prepulzní inhibici úlekové reakce, což je další z projevů schizofrenie, který odráží schopnost zpracovat a filtrovat informace. Tento deficit může být potlačen předchozím podáním haloperidolu (Japha a Koch, 1999).

Poslední teorií vzniku schizofrenie je teorie glutamatergní. Glutamatergní hypotéza je spojena s dysfunkcí glutamatergního neurotransmiterového systému a s hypofunkcí NMDA receptorů (Olney a Farber, 1995). Původ myšlenky, že je u schizofrenie narušen právě glutamatergní přenos, se datuje do roku 1950, kdy bylo poprvé ukázáno, že disociativní anestetikum a droga fencyklidin (PCP), non-kompetitivní antagonist NMDA receptorů, u zdravých jedinců navozuje příznaky podobné schizofrenii (Luby et al., 1959). Poté byly provedeny další studie, které dokázaly, že non-kompetitivní antagonisté glutamátových NMDA receptorů jako je fencyklidin a ketamin skutečně indukují jak pozitivní, tak negativní symptomy schizofrenie, včetně kognitivního deficitu u zdravých jedinců (Javitt a Zukin, 1991), a také výrazně zhoršují tyto příznaky a deficity u pacientů se schizofrenií (Lahti et al., 1995). Modifikací glutamatergní teorie je neurovývojová hypotéza vzniku schizofrenie. Ta je založena na předpokladu, že porucha vývoje centrální nervové soustavy během prenatálního nebo perinatálního období po dosažení adolescence nebo v časně dospělosti vyvolává dysfunkci mozku a projevy schizofrenie se snížením glutamatergního přenosu. To dokázaly i neurovývojové animální modely s využitím antagonistů NMDA receptorů, které např. po aplikaci MK-801 (Harris et al., 2003) v pozdním fetálním nebo časném postnatálním období doložily u potkanů větší poškození mozku (Wang et al., 2001).

2. Glutamát a jeho receptory

Glutamát je hlavní excitační neuropřenašeč v centrální nervové soustavě savců (CNS). Ačkoliv se většina glutamátu nachází v mozku, podílí se tato látka i na intermediálním metabolismu a dalších funkcích mimo CNS. Glutamátové receptory zprostředkovávají téměř polovinu synaptického přenosu v celé CNS (Hollmann a Heinemann, 1994). Jeho správné koncentrace a neporušená neurotransmise jsou důležité pro funkce a vývoj mozku (Pearce et al., 1987), formaci a eliminaci synapsí, proliferaci, diferenciaci a růst neuronů (Nguyen et al., 2001). V běžných fyziologických podmínkách dosahují koncentrace glutamátu v synaptické štěrbině až 1mM (Clements et al., 1992). Pokud ovšem není toto množství zpětně vychytáváno, dochází vlivem akumulace glutamátu k excitotoxickému poškození buněk. Abnormální glutamátová neurotransmise je spojována s etiologií a patofyziologií mnoha psychiatrických poruch a zvýšené uvolňování glutamátu má také svoji roli v excitotoxicitě. Ta nastává po nadměrné aktivaci glutamátových receptorů, především NMDA receptorů, což způsobí zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} na patologickou úroveň a spuštění procesů aktivující buněčnou smrt (Arundine a Tymianski, 2003). Tato buněčná smrt může nastat dvěma způsoby. Ovlivňuje to jak intenzita, tak doba poškození glutamátem. Typ apoptotického poškození buněk nastává po vystavení se nižším koncentracím glutamátu, a vystavení vysokým koncentracím glutamátu vede k nekrotickému poškození buněk (Bonfoco et al., 1995).

Glutamát působí prostřednictvím dvou hlavních typů receptorů, a to ionotropních, což jsou ligandem řízené kationtové kanály, a metabotropních, které jsou spojeny s G-proteiny (Kew a Kemp, 2005). Přestože jsou glutamátové receptory exprimovány především v CNS, stojí za zmínku i jejich výskyt v buňkách pankreatu, kde modulují sekreci inzulinu (Inagaki et al., 1995), v osteoblastech a osteoklastech, kde antagonisté NMDA receptorů zpomalují kostní resorpci (Chenu et al., 1998), a některé podjednotky ionotropních glutamátových receptorů jsou také přítomny v srdečních gangliích, kde je jejich funkce zatím neznámá (Gill et al., 1998). Ionotropní receptory zprostředkovávají rychlý excitační přenos téměř na všech podtypech neuronů v mozku. Metabotropní receptory byly objeveny později, mají vysokou afinitu ke glutamátu a aktivují signální kaskády druhých posílů. Právě jejich objev skýtá nové příležitosti k vývoji léků pro psychiatrické poruchy, mající svůj základ v narušené glutamátergní neurotransmisi, přičemž látky zaměřené na metabotropní receptory modifikují tento přenos selektivněji (Moghaddam, 2004).

2.1. Metabotropní glutamátové receptory

Doposud bylo objeveno, naklonováno a popsáno nejméně osm typů metabotropních glutamátových receptorů (mGluR). Nazývají se mGluR1 až mGluR8 a rozdělují se do tří skupin: I. až III., primárně dle sekvenční identity, transdukčního mechanismu a farmakologie. Do skupiny I. patří mGluR1 a mGluR5 a jejich funkce je spřažena především s proteiny Gq/G11 a fosfolipázou C,

zatímco skupina II. (mGluR2 a mGluR3) a skupina III. (mGluR4, 6, 7, 8) funguje přes Gi/Go proteiny, které jsou spojeny s inhibiční aktivitou adenylycyklázy. Mezi jejich agonisty, tedy látky, které se na receptory váží a vyvolávají nějaký účinek, patří glutamát nebo ibotenát (Kew a Kemp, 2005).

Od ionotropních receptorů se liší v několika věcech, což z nich dělá další důležité farmakologické cíle. Za prvé jejich aktivace na rozdíl od rychle zprostředkovaného přenosu ionotropními receptory moduluje neuronální aktivitu pomaleji a dlouhodoběji. Toho je dosaženo díky aktivaci signálních drah druhých posílů a přímým působením na $\beta\gamma$ podjednotky heterotrimerického G-proteinu (Kew a Kemp, 2005). Druhým důvodem je jejich rozmanitost a heterogenita v distribuci a funkci. Různé podtypy těchto receptorů jsou odlišně lokalizovány i na buněčné úrovni. Například mGluR2 a mGluR3 se ve vysokých hustotách nacházejí v mozkové kůře a limbických regionech (Phillips et al., 2000), zatímco výskyt mGluR6 byl potvrzen v retině (Vardi et al., 2000). Receptory mGlu1 a mGlu5 existují v mozku převážně jako homodimery (Romano et al., 1996).

Na základě rozsáhlých preklinických studií bylo zjištěno, že tři podtypy metabotropních glutamátových receptorů mají potenciál pro zlepšení kognitivního deficitu u schizofrenie, který vyvolává dysfunkce NMDA receptorů. Jsou to receptory mGlu5, které moduluji přímo funkci NMDA kanálu, a receptory mGlu2 a mGlu3, které regulují uvolňování glutamátu. U mGlu5 receptorů však dochází k velmi rychlé desensitizaci, což z jejich agonistů nedělá účinné cíle terapeutického působení (Moghaddam, 2004), nicméně bylo zjištěno, že antagonisté mGlu5 receptorů zvyšují účinky antagonistů NMDA receptorů na hyperlokomoci a pracovní paměť (Homayoun et al., 2004). Receptory mGlu2 a mGlu3 se vyskytují především v mozkové kůře, *nucleus accumbens*, amygdale a hipokampu (Phillips et al., 2000; Tamaru et al., 2001). Jsou zde lokalizovány v různých kombinacích, ať už jako presynaptické, postsynaptické nebo extrasynaptické elementy. Existuje řada studií, které naznačují, že aktivace těchto receptorů „normalizuje“ uvolňování glutamátu pravděpodobně přes presynaptické receptory lokalizované na excitačních terminálech (Battaglia et al., 1997). Agonisté mGluR2 redukuji stereotypní chování, hyperlokomoci a deficity v prostorové paměti a v glutamátergní neurotransmisi (Moghaddam a Adams, 1998).

2.2. Ionotropní glutamátové receptory

Ionotropní glutamátové receptory jsou ligandem řízené iontové kanály. Existují tři typy ionotropních GluR, pojmenované podle svých typických selektivních agonistů. Agonistou NMDA receptorů je N-methyl-D-aspartát, AMPA receptorů α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát a v případě kainátových receptorů kainát. AMPA a kainátové receptory se od NMDA receptorů liší, proto jsou někdy nazývány jako non-NMDA receptory. Nativní formy receptorů z této rodiny mají tetramerické uspořádání. Průměrná vodivost těchto kanálů závisí na tom, nakolik jsou podjednotky obsazeny agonistou (Rosenmund et al., 1998). NMDA i ostatní ionotropní receptory jsou aktivovány endogenním neurotransmiterem L-glutamátem, zatímco aspartát pravděpodobně aktivuje výhradně

NMDA receptory (Patneau a Mayer, 1990). Zatímco AMPA receptory zpravidla vykazují selektivitu pro draslík a sodík, NMDA receptory obsahují kationtový kanál, propustný navíc i pro vápník. Ionotropní GluRs jsou exprimovány téměř na všech podtypech neuronů a zprostředkovávají rychlý excitační přenos. Proto jejich přímé farmakologické manipulace mohou působit globální narušení mozkových funkcí a vedlejší efekty antipsychotické léčby jako narušení pohybu, pozornosti a paměti (Moghaddam, 2004).

2.2.1. AMPA receptory

AMPA receptory se skládají ze čtyř podjednotek, nazývaných GluR1-4. Podjednotka GluR2 je důležitá vzhledem k jejich propustnosti pro vápenaté ionty. AMPA receptory, které jí nemají, jsou pro ně propustné (Kew a Kemp, 2005). Synaptické AMPA receptory reagují na glutamát rychle, přechodně a také dochází k jejich rychlé desenzitizaci, v důsledku difuze a rychlého odstraňování glutamátu ze synaptické štěrby (Clements et al., 1992). Rozdílná afinita AMPA a NMDA receptorů ke glutamátu má významné funkční důsledky. Většinou jsou tyto receptory na synapsích kolokalizovány a rychlá aktivace a krátká doba otevření AMPA receptoru umožňuje depolarizační odblokování hořčického bloku z NMDA receptorů a takto pomáhají AMPA receptory k jejich aktivaci (Dingledine et al., 1999).

2.2.2. Kainátové receptory

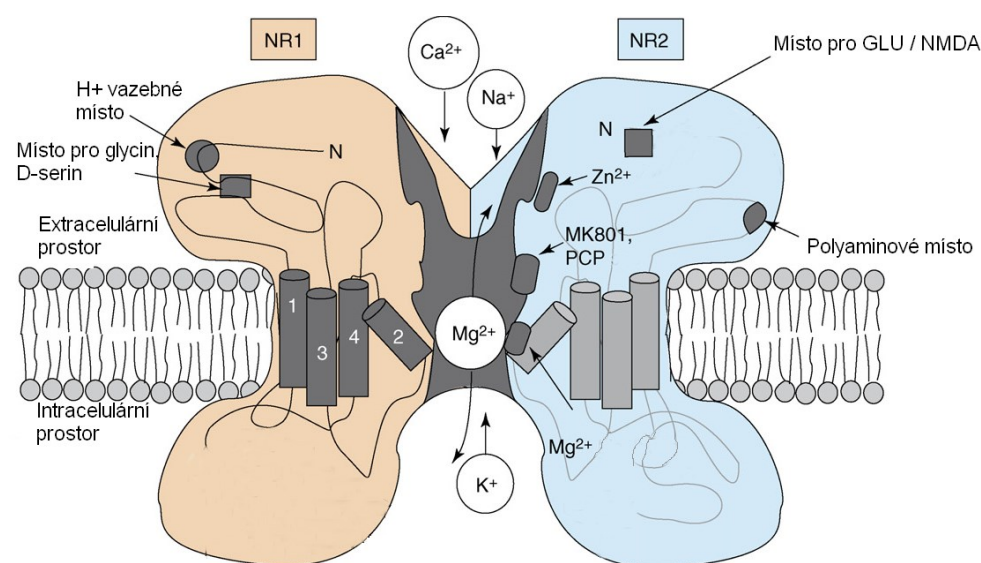
Kainátové receptory jsou složeny ze dvou podjednotkových rodin GluR5-7 a KA-1 a 2. Opět to jsou tetramery. Podjednotky KA1 a 2 formují vysokoafinitní vazebná místa a váží tedy ligandy (Kew a Kemp, 2005).

2.2.3. NMDA receptory

Jak bylo zmíněno výše, NMDA receptory patří mezi ligandem řízené iontové kanály a zprostředkovávají většinu excitačního přenosu v mozku. Mají důležité role ve vývoji a formování synaptické plasticity, neuronálním růstu a diferenciaci (Pearce et al., 1987), dále také napomáhají správné migraci neuronů ve vyvíjejícím se kortexu (Behar et al., 1999) a jsou rozhodující pro indukci dlouhodobé potenciace (Collingridge et al., 1983). Jejich nedostatečná nebo naopak nadměrná funkce přispívá patrně k patofyziologii několika neurologických poruch, jako je epilepsie, ischemické poškození mozku, Parkinsonova, Alzheimerova a Huntingtonova choroba nebo amyotrofni laterální skleróza (Dingledine et al., 1999). Snížená aktivita NMDA receptorů hraje také roli v kognitivním deficitu u schizofrenie a zaměření se na ně může být tudíž vhodná strategie pro léčbu, protože zablokování těchto receptorů působí zhoršení kognitivních funkcí (Krystal et al., 1994).

NMDA receptory se nachází v různých densitách téměř ve všech částech mozku, postsynapticky v Purkyňových buňkách mozečku, v mozkové kůře (Petrálie et al., 1994), některé i na

gliových buňkách (Müller et al., 1993), ale jejich největší hustota je v hipokampu (Cotman et al., 1987). Skládají se z funkčních podjednotek, nazývaných NR podjednotky. Existuje jich celkem sedm typů: NR1, NR2A – D, NR3A a NR3B, z nichž je každá kódována unikátními geny. Každá podjednotka je dále tvořena z šesti domén, a to z M1, M2, M3, M4, S1 a S2. M1 až M4 jsou membránové domény, a S1 a S2 obsahují vazebná místa pro endogenní a exogenní ligandy NMDA receptorů jako je například glutamát nebo glycin, pro jejich kompetitivní antagonisty, alosterické modulátory jako jsou polyaminy nebo steroidy, a také pro blokátory otevřeného iontového kanálu jako Mg^{2+} , fencyklidin a MK-801 (Dingledine et al., 1999).



Obr. č. 1. Schematické znázornění organizace NMDA receptoru, NR podjednotek a vazebných míst pro některé ligandy (převzato a upraveno z Kristiansen et al., 2007).

Funkční NMDA receptor je tetramer, složený buď z NR1 a alespoň jedné NR2 podjednotky, nebo z NR1 podjednotek v kombinaci s NR2 a NR3 podjednotkami. Existuje osm izoform podjednotky NR1, které vznikají alternativním sestřihem. Podjednotky NR2 jsou čtyř různých druhů: NR2A-D, které mají v mozku nerovnoměrné rozložení (Dingledine et al., 1999). U člověka a hlodavců jsou podjednotky NR2A a NR2B v nadbytku v předním mozku, NR2C v mozečku a NR2D v mezimozku a středním mozku (Kew a Kemp, 2005). Podjednotka NR3A je převážně exprimována během vývoje, ale u některých populací neuronů přetrvává až do dospělosti. Bylo zjištěno, že myši, jejichž NMDA receptory neobsahují NR3A podjednotku, mají zvýšenou neurotransmisi přes tyto receptory a větší počet dendritických trnů v raných fázích vývoje neuronů (Das et al., 1998). Na rozdíl od toho je výskyt podjednotky NR3B omezen na somatické motoneurony mozkového kmene a páteřní míchy, kde má regulační roli a kontroluje zde transmissi prostřednictvím NMDA receptorů (Nishi et al., 2001).

NMDA receptory na rozdíl od ostatních ligandem řízených iontových kanálů potřebují mít pro svoji aktivaci na vazebných místech navázány dva ko-agonisty: glutamát a glycin. Glycinová vazebná místa jsou na NR1 podjednotkách, a glutamátová na NR2 podjednotkách (Kew a Kemp, 2005). Mezi jejich další vlastnosti patří vysoká permeabilita pro vápenaté ionty, která je regulovaná napětově závislou bloádou hořečnatými ionty. Za klidového membránového potenciálu blokují ionty Mg^{2+} ústí kanálu, tudíž nedochází k jejich otevírání a toku iontů (Nowak et al., 1984). Existuje množství modulačních míst, kam se mohou vázat látky ovlivňující aktivitu NMDA receptorů. Nejběžnějším agonistou je samotné NMDA, které se váže na glutamátové vazebné místo na NR2 podjednotce. Mezi další patří L-aspartát nebo homocysteát. Kompetitivním antagonistou glutamátového místa je např. (R)-2-amino-5-fosfonopentanová kyselina (D-AP5). Další možností je glycinové vazebné místo, kam se váží agonisté jako glycin nebo D-serin (Kew a Kemp, 2005). Blokátory iontového kanálu NMDA receptoru jsou velkou skupinou účinných selektivních antagonistů těchto receptorů. Jako první z této skupiny byla objevena disociativní anestetika ketamin a fencyklidin (Anis et al., 1983), následně i MK-801 (Wong et al., 1986).

2.2.3.1. NMDA receptory a jejich vztah ke schizofrenii

Důležitost glutamátergního systému v patogenezi schizofrenie se opírá o nálezy molekulárních interakcí a funkčního uspořádání neuronů a genů asociovaných s touto nemocí. Jeden z modelů podporující narušení glutamátergní neurotransmise přes NMDA receptory vychází z hypotézy hypofunkce NMDA receptorů, která je navozena jejich antagonisty. Mechanismus patofyziologie schizofrenie může zahrnovat dysfunkci NMDA receptorů, kterou lze modelovat právě jejich bloádou, a která má za následek zvýšené uvolňování glutamátu v PFC (Moghaddam et al., 1997). Následná nadměrná stimulace postsynaptických neuronů může vysvětlovat kognitivní zhoršení (Olney a Farber, 1995). Nejčastěji se výzkumy zaměřují na modelování psychózy s použitím non-kompetitivních antagonistů NMDA receptorů jako je fencyklidin, ketamin a MK-801. To proto, že tyto látky zhoršují kognitivní funkce takovým způsobem, který je pozorován u pacientů se schizofrenií (Krystal et al., 1994).

Dalším důkazem pro narušení glutamátergního systému jsou *post-mortem* studie, které zjistily abnormální změny glutamátových synapsí u pacientů se schizofrenií (McCullumsmith a Meador-Woodruff, 2002). Tyto *post-mortem* studie společně se zobrazovacími a psychologickými výzkumy poukazují na to, že korové regiony jsou primární místa dysfunkce u schizofrenie (Lewis a Anderson, 1995), a neurony, které z nich mohou přenášet abnormálně zpracované informace, jsou buňky uvolňující glutamát. Jedna studie našla *post-mortem* zvýšenou vazbu na NMDA receptory v PFC, hipokampu, amygdale a entorhinálním kortexu u pacientů se schizofrenií (Kornhuber et al., 1989). Stejně tak bylo popsáno snížené uvolňování glutamátu ve frontálním a temporálním kortexu (Sherman et al., 1991) a také vyšší koncentrace glycinu, serinu a glutamátu v krvi pacientů, které mohou

narušovat normální funkci NMDA receptorů (Macciardi et al., 1990). Dále byla v mediálním temporálním laloku u pacientů se schizofrenií objevena snížená exprese podtypů i non-NMDA receptorů pro kainát a quisqualát (Kerwin et al., 1990).

U schizofrenie také dochází ke strukturním změnám NMDA receptorů a dalším přístupem ke studiu jejich úlohy v patogenezi této nemoci je zkoumání a hodnocení změn v transkriptech a proteinové expresi jejich podjednotek. Cílené narušení NR2A podjednotky u potkanů vede k významně snížené neurotransmisí přes NMDA receptory. Tato zvířata dále vykazují deficity v prostorovém učení (Sakimura et al., 1995). Na projevené změny podjednotkového složení může mít vliv také doba zásahu. V thalamu jedna studie našla u mladší skupiny subjektů zvýšenou expresi transkriptu pro NR1 podjednotku (Clinton a Meador-Woodruff, 2004), zatímco u starší skupiny pacientů byla exprese transkriptu pro NR1, NR2B a NR2C podjednotky snížena (Ibrahim et al., 2000). V hipokampu byla další studií, která mapovala změny podjednotek NMDA receptorů u schizofrenie, zjištěna snížená exprese podjednotky NR1, výraznější v levé hemisféře (Law a Deakin, 2001), zvýšená exprese transkriptu pro podjednotku NR2B a nezměněná exprese podjednotky NR2A (Gao et al., 2000). Výsledky jiné studie ukázaly, že právě MK-801 pozměňuje expresi podjednotek NR1 a NR2 NMDA receptorů takovým způsobem, který připomíná morfologické změny zjištěné u schizofreniků (Rujescu et al., 2006).

3. Animální modely schizofrenie

Animální modely komplexních psychiatrických poruch, jako je právě schizofrenie, nejenom významně přispívají k porozumění jejich neurobiologie, ale jsou také významné pro vývoj nových antipsychotik. Na rozdíl od výzkumů schizofrenie přímo na lidských pacientech je jejich výhodou rychlejší progresse onemocnění, možnosti invazivního monitoringu strukturálních a molekulárních změn s vysokou rozlišovací schopností, a testování nových léčebných postupů (Jones et al., 2011).

Aby mohly být animální modely experimentálně využívány, je důležitá jejich spolehlivost. Proto byla vytvořena kritéria, které definují osy validity (angl. *axis of validity*) modelů. Každý animální model by měl mít jednak konstrukční validitu, která odráží genetické, neurochemické a strukturální defekty a patologii schizofrenie, prediktivní validitu, která ukazuje očekávanou farmakologickou odpověď na léčbu, a nakonec fenomenologickou validitu, která značí, na kolik jsou si podobné změny chování u zvířecího modelu a u pacienta (Jones et al., 2011).

Nicméně do dnešní doby bohužel neexistuje jediný animální model schizofrenie, který by optimálně spojoval všechny tři výše zmíněné osy validity, jelikož psychóza, kterou u pacientů můžeme pozorovat, je porucha typická pro lidi, a celé spektrum příznaků, jako například halucinace, není u zvířat přímo reprodukovatelné. Proto se pro účely animálního modelování této nemoci každému klinickému aspektu přiřadila odpovídající změna v chování u zvířat, která s určitým zjednodušením

odráží právě příznaky nemoci u pacientů. Animální modely schizofrenie se dělí na farmakologické, genetické a neurovývojové (Lipska a Weinberger, 2000).

Klinické příznaky schizofrenie	Změna v chování v animálním modelu schizofrenie
Psychotické příznaky	Hyperlokomoce vyvolaná antagonisty NMDA receptorů (dopaminergními látkami)
Stereotypní chování	Stereotypie indukovaná antagonisty NMDA receptorů (dopaminergními látkami)
Zvýšená náchylnost ke stresu	Hyperlokomoce vyvolaná stresem
Deficit v pozornosti	Deficit v latentní inhibice po podání antagonistů NMDA receptorů (amfetaminu)
Kognitivní deficit	Zhoršení prostorové paměti
Sociální deficit	Snížení sociálního kontaktu mezi zvířaty po podání antagonistů NMDA receptorů

Tabulka č. 1. Klinické aspekty schizofrenie a příslušné změny v chování zvířat u animálních modelů (převzato a upraveno z Lipska a Weinberger, 2000).

3.1. Farmakologické animální modely

Nejběžnějším typem modelů jsou farmakologické. Tyto modely mají dobrou konstrukční i prediktivní validitu, vycházejí z hypotéz vzniku schizofrenie a využívají akutní nebo chronické aplikace látek, působící na dopaminergní, serotonergní a glutamatergní systém (Geyer a Moghaddam, 2002). Hyperfunkce v mesolimbickém dopaminovém systému spolu s dopaminergní dysregulací dala základ farmakologickému animálnímu modelu schizofrenie založenému na aplikaci amfetaminu. Psychóza navozená amfetaminem byla prvně popsána kolem roku 1950, a u lidí ji pozorujeme jako sluchové halucinace a bludy. U hlodavců působí chronické i akutní podávání amfetaminu hyperaktivitu (Robinson a Becker, 1986). Bylo navrženo, že stereotypní chování navozené amfetaminem může u opic napodobit stereotypii pozorovanou u schizofrenie. Těmto behaviorálním efektům lze zabránit předchozí aplikací antipsychotik haloperidolu a chlorpromazinu. Sociální izolace, kterou amfetamin u opic vyvolává také, může být připodobněna k sociálnímu stažení. Stejně jako u pacientů se tato zvířata aktivně vyhýbají ostatním, ale v tomto případě změna v chování neodezní ani po aplikaci haloperidolu a chlorpromazinu (Geyer a Moghaddam, 2002).

Brzy po prvotních zmínkách o účincích LSD na chování začali vědci zkoumat myšlenku, že třída látek zastoupená LSD může být využívána jako psychotomimetika. Tato hypotéza byla podpořena podobnostmi mezi efekty LSD na vnímání a emoce a symptomy v raných fázích psychózy. Počáteční zájem o halucinogeny byl ještě umocněn zjištěním, že abnormality v biochemii mohou vést k endogenní produkci derivátů těchto sloučenin a tím pádem mohou být zodpovědné za některé psychotické příznaky. Transmethylační hypotéza například říká, že serotonin může být substrátem pro endogenní produkci halucinogenů podobných N,N-dimethyltryptaminu (DMT) (Geyer a Moghaddam,

2002). Původně byl tento model zamítnut kvůli rychlé toleranci na halucinogeny jako je LSD a meskalin. Nicméně nedávné studie ukázaly, že u DMT k žádné toleranci nedochází (Strassman et al., 1996), což naznačuje jeho odlišnost od ostatních halucinogenů, a model založen na jeho aplikaci může být validní. Navíc je možné, že tyto látky odráží některé aspekty psychotických epizod u lidí. Nálezy abnormalit v serotonergním systému u schizofrenie (Joyce et al., 1993) a účinnost atypických antipsychotik, které působí přes 5-HT_{2A} receptory přispěly ke znovuoživení zájmu o tento model. Navíc mnohé z novějších atypických antipsychotik jsou silní antagonisté 5-HT_{2A} receptorů (Meltzer et al., 1989).

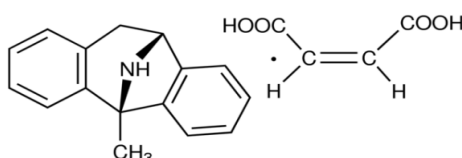
Další populární přístup v animálním modelování zahrnuje modely s farmakologicky narušenou funkcí mozku a chování pomocí antagonistů NMDA receptorů. Nejčastěji se používají látky fencyklidin (PCP), ketamin a MK-801, které navozují behaviorální chování podobné schizofrenii (Geyer a Moghaddam, 2002). Nízké dávky ketaminu a fencyklidinu se váží k vazebnému místu v iontovém kanálu NMDA receptorů a tím je selektivně blokují. Existuje několik zajímavých aspektů těchto modelů, které je odlišují od ostatních. Například fakt, že na rozdíl od modelů založených na aplikaci dopaminu mají velkou konstrukční validitu pro studium kognitivního zhoršení. Non-kompetitivní antagonisté NMDA receptorů zhoršují pracovní paměť, *set-shifting* a další kognitivní funkce a dále navozují hyperaktivitu a stereotypní chování (Javitt a Zukin, 1991). Přestože také zvyšují neurotransmisi dopaminu v limbických oblastech (Mathé et al., 1998), jsou jejich účinky na lokomoci a pracovní paměť na dopaminu nezávislé (Adams a Moghaddam, 1998). Dlouhodobé podávání antagonistů NMDA receptorů vede k poklesu extracelulárních hladin glutamátu v PFC u myší, zatímco akutní podání MK-801 vede ke zvýšení glutamátové neurotransmise (Zuo et al., 2006).

Prvně popsané schizofrenii-podobné chování bylo doloženo po aplikaci fencyklidinu (PCP), který byl zaveden do klinické praxe v 50. letech 20. století. PCP je látka, původně využívaná jako disociativní anestetikum. Brzy se však ukázalo, že jeho podávání způsobuje řadu nepříznivých účinků a může způsobit i závislost. Chronická aplikace PCP vyvolává neurochemické změny, podobné těm u schizofrenie, jako například zvýšená odpověď mesolimbického dopaminového systému na amfetamin (Jentsch et al., 1998). Aplikace PCP u hlodavců vyvolává stereotypní chování (Sams-Dodd, 1996), sociální stažení (Corbett et al., 1995) a poruchy v prepulzní inhibici (Keith et al., 1991). U zdravých jedinců navozuje příznaky, které se velmi podobají pozitivním a negativním symptomům schizofrenie, a u pacientů tyto příznaky ještě zhoršuje (Javitt a Zukin, 1991). Lokální injekce PCP do mediální prefrontální kůry u potkanů snižuje extracelulární hladiny GABA (Yonezawa et al., 1998). Jednou z výhod chronických modelů PCP je možnost převést závěry z pokusů na hlodavcích na primáty. Opakované podávání PCP také u opic způsobuje deficity v úkolech závislých na PFC, které mohou být zmírněny klozapinem (Jentsch et al., 1997).

Ketamin byl syntetizován v roce 1962 a jako anestetikum představen roku 1970. Mimo jiné vyvolává noční můry, pocity depersonalizace, derealizace a změny emocí. Díky svým specifickým psychotomimetickým vlastnostem se používá v klinických studiích k modelování schizofrenie. Ketaminový model byl poprvé verifikován badatelem Krystalem, který zkoumal, zda aplikace ketaminu indukuje spolehlivé změny v chování a parametry v dopaminergní, serotonergní a glutamatergní neurotransmisi, které by mohly dát základ animálním modelům pro výzkum schizofrenie (Krystal, 1991). Tuto hypotézu otestovala a potvrdila studie, ve které byl potkanům pět dní za sebou aplikován ketamin v dávce 30 mg/kg. Tato zvířata po nějaké době vykazovala zvýšenou motorickou aktivitu a poruchy v latentní inhibici. Z hlediska molekulárních změn u nich došlo ke snížené vazbě na glutamátový receptor v PFC, zvýšené vazbě na D2 receptor v hipokampu a zvýšil se počet 5-HT transportérů ve *striatu*, hipokampu a mozkové kůře (Becker et al., 2003). Tato zjištění naznačují, že ketamin narušuje dopaminergní přenos v PFC a tím zároveň i kognitivní funkce. U zdravých jedinců navozuje jak pozitivní, tak negativní symptomy schizofrenie. Subanestetické dávky ketaminu u zdravých dobrovolníků mají za následek kognitivní dysfunkci asociovanou s hipokampální oblastí mozku (Bubeníková-Valesová et al., 2008). Porovnání účinků subanestetických dávek ketaminu u zdravých dobrovolníků a schizofrenních pacientů přineslo významné zjištění i v oblasti halucinací. Zatímco u zdravých jedinců ketamin málokdy vyvolává pro schizofrenii typické sluchové halucinace (Krystal et al., 1999) u pacientů působí halucinace jak zrakové, tak i akustické (Lahti et al., 1995).

Dalším vhodným animálním modelem pro testování kognitivního deficitu je model založený na aplikaci MK-801. MK-801 je selektivní non-kompetitivní antagonist NMDA receptorů, který k nim má vysokou afinitu (Wong et al., 1986). MK-801 bylo objeveno a patentováno v roce 1982 společností Merck Company jako efektivní antikonvulzivum a neuroprotektivní látka, ukázalo se účinným i v prevenci experimentální ischemie (Ozyurt et al., 1988). Původně vědci zjistili, že v animálních modelech epilepsie a excitotoxicity zmírňuje metabolické účinky záchvatů, které navodila kyselina homocysteová (Folbergrová et al., 2000) a různé excitotoxiny jako NMDA a kainát (Akaike a Himori, 1993). Dále výrazně zmírňovalo epileptické záchvaty vyvolané stimulací hipokampu *in vitro* (Apland a Cann, 1995). Také bylo zjištěno, že je účinné u animálních modelů epileptogeneze (Gilbert, 1988). MK-801 se proto využívalo i v několika klinických testech. Bylo testováno u pacientů s ADHD a u části z nich zlepšovalo poruchy nálad (dávky 0,025 až 0,15 mg/kg). Další klinická studie testovala vliv MK-801 na úzkostnou poruchu, ta byla ale brzy přerušena kvůli zhoršení symptomů u převážné většiny pacientů (Reimherr et al., 1986). Také proto bylo z klinických testů později vyřazeno, a navíc se ukázalo, že u experimentálních zvířat jeho vyšší dávky vyvolávají neuropatologické poškození buněk - Olneyho léze (Olney et al., 1989), což jsou morfologicky detekovatelné vakuolizace a poškození mitochondrií v rámci neuronů, které lze pozorovat elektronovou mikroskopií v oblastech mozkového kortexu u potkanů jako je např. retrosplenální kůra

(Olney et al., 1991). Brzy poté začalo MK-801 přitahovat pozornost vědců, zaměřených na animální modelování schizofrenii-podobného chování, protože se zjistilo, že u potkanů a myši vyvolává stereotypní chování a hyperlokomoci. U animálních modelů navozuje aplikace MK-801 jednotvárné chování, zhoršuje výkony v úloze vyhýbání se místu (Ohno a Watanabe, 1996), v úlohách v radiálním bludišti (Pitkänen et al., 1995) a v Morrisově vodním bludišti (Lukoyanov a Paula-Barbosa, 2000). Ukázalo se, že účinky navozené MK-801 mohou být zmírněny inhibitory acetylcholinesterázy jako je např. donepezil a galantamin (Csernansky et al., 2005). Chronické podávání MK-801 působí změny i v architektuře mozkových oblastí. V hipokampu potkanů zvyšuje extracelulární hladiny glutamátu (Genius et al., 2013) a expresi podjednotek NR1 a NR2B a zároveň snižuje expresi NR2A (Oh et al., 2001). Všechna tato zjištění vyvolala velký zájem o využití MK-801 jako psychotomimetické látky a látky selektivně narušující kognici (*cognition impairer*) a tyto výzkumy přetrvávají dodnes.



Obr. č. 2. Strukturní vzorec MK-801: (5S,10R)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleát). (převzato ze SigmaAldrich s.r.o. - <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m107?lang=en®ion=CZ>)

3.2. Genetické animální modely

Tyto typy modelů vychází z oblasti molekulární biologie. Používá se v nich genetického inženýrství k vytváření transgenních a *knock-out* zvířat a zaměřují se na identifikaci fenotypových rozdílů a chování, které jsou pro poruchu relevantní. Geneticky modifikovaná zvířata jsou výhodná pro pochopení role těchto genů v kognitivních abnormalitách (Lipska a Weinberger, 2000). Jeden z modelů, který vychází z dysfunkce NMDA receptorů a odráží etiologii a patofyziologii schizofrenie, je založen na snížené expresi podjednotky NR1. Geneticky upravené myši, exprimující pouze 5% z původní NR1 podjednotky, vykazují zvýšenou motorickou aktivitu, stereotypní chování a deficity v sociálních interakcích. Tyto behaviorální změny mohou být zlepšeny haloperidolem nebo klozapinem (Mohn et al., 1999). Animální model myši s bodovou mutací v glycinovém vazebném místě na NR1 podjednotce (Grin1) vykazuje až pětinasobné snížení afinity receptoru. Tyto mutantní myši vykazují dysfunkci NMDA receptorů, hyperlokomoci a horší výkony v Morrisově vodním bludišti (Ballard et al., 2002).

Jedním z prvních genů, o kterém se vědělo, že se podílí na patogenezi schizofrenie, byl *disrupted-in-schizophrenia 1* (DISC1). DISC1 je synaptický protein, který je exprimován v časně fázi vývoje a hraje nezbytnou roli v prenatálním a postnatálním vývoji neuronů během synaptogeneze,

neuronální migrace a synaptické plasticitě. U transgenních DICS-1 myši bylo pozorováno několik patologických a behaviorálních změn, jako je zvětšení postranních komor, snížení kortikální tloušťky a objemu mozku. Některé DISC-1 mutanty vykazují snížené množství GABA PV-inter neuronů v PFC a hipokampu (Jones et al., 2011).

Další kandidát rizikových genů je neuregulin-1 (NRG1) a jeho receptor ERBB. NRG1 je pleiotropní růstový faktor obsahující *EGF-like* doménu, která je kriticky důležitá pro vývoj a funkci nervového systému. Stejně jako je NRG1 zapojen do excitační a inhibiční neurotransmise ve zralém mozku, tak se také účastní synaptogeneze, myelinizace a interakcí neuronů s gliovými buňkami ve vyvíjejícím se mozku (Harrison a Law, 2006). Kromě toho během vývoje reguluje expresi podjednotek GABA, acetylcholinových a glutamátových receptorů. Například v řezech granulárních buněk z mozečku byla nalezena zvýšená exprese mRNA pro podjednotku NR2C (Ozaki et al., 1997). Zvířata s tímto upraveným genem jsou hyperaktivní, mají zhoršenou prepulzní inhibici a deficity v sociálních interakcích (Jones et al., 2011).

3.3. Neurovývojové animální modely

Tato skupina modelů je založena na neurovývojové hypotéze vzniku schizofrenie, která říká, že vznik schizofrenie souvisí s narušením mozku v časně fázi jeho vývoje (Weinberger, 1987). Mezi tyto modely patří neonatální léze ventrálního hipokampu, neonatální inhibice NMDA receptorů, sociální izolace po narození nebo perinatální infekce. Lidská epidemiologie poskytuje důkazy pro to, že poruchy během perinatálního života jako je mateřský stres, podvýživa, infekce, nebo komplikace během porodu zvyšují riziko propuknutí schizofrenie tím, že v mozku dojde ke změnám neuronální konektivity a jeho celkové funkce. Není důležité, jaký podnět tyto změny navodí, ale velmi kritickým aspektem je čas, kdy se tak stane. Neurovývojové animální modely schizofrenie využívají manipulace prostředí nebo aplikace látek během citlivého perinatálního období, což má za následek nevratné změny ve vývoji CNS, které se projeví až v dospělosti. V důsledku s dobrou fenomenologickou validitou těchto modelů je fakt, že dlouhodobé změny chování typické pro schizofrenii se obvykle objevují v pubertě (Jones et al., 2011).

Jeden typ neurovývojových animálních modelů využívá aplikace metylazoxymetanolu acetátu (MAM) březím samicím, nejčastěji 17. gestační den. U jejich potomků lze po porodu pozorovat neuropatologické změny jako je snížení objemu mediodorsálního talamu, hipokampu a parahipokampálních oblastí (Moore et al., 2006). Mezi behaviorální změny, které se u nich projeví, patří sociální izolace, deficity v pracovní a prostorové paměti a v behaviorální flexibilitě (Ratajczak et al., 2013).

Také traumatická zkušenost v raném životním stadiu, jako například separace od matky po narození může vyústit v rozvoj psychotické poruchy. Metoda mateřské deprivace, další typ neurovývojového animálního modelu, spočívá v odloučení novorozených potkanů na 24 hodin od

svých matek v PND 9. Ukázalo se, že toto odloučení vyvolává deficity v prepulzní inhibici úlekové reakce nebo latentní inhibici, hyperaktivitu a kognitivní zhoršení (Jones et al., 2011).

Lézové modely dovolují u zvířat přesně cílené zásahy do oblastí mozku a tím pádem může dojít k srovnání výsledků s neurobiologickými studiemi u lidí. Nejlépe charakterizovaný model této třídy zahrnuje neonatální excitotoxické léze ventrálního hipokampu, a popsali ho vědci Lipska a Weinberger (Lipska a Weinberger, 1993). Tyto léze po dosažení adolescence navozují u animálních modelů změny v chování jako je hyperlokomoce, stereotypie, deficity v prepulzní inhibici, zhoršená pracovní paměť a větší citlivost na stresové stimuly. Kromě toho vede tato manipulace k buněčným a molekulárním změnám asociovaným se schizofrenií, jako například snížená exprese glutamátového transportéru pro aminokyseliny nebo GAD67. Bylo také prokázáno, že dopaminoví antagonisté tyto výše zmíněné behaviorální abnormality zmírňují (Lipska a Weinberger, 2000). Data jedné studie ukázala, že dokonce i přechodná inaktivace ventrálního hipokampu během kritického období ve vývoji vytvoří tyto změny jak v chování, tak v anatomii mozkových struktur (Lipska, 2004).

3.3.1. Animální modely psychózy založené na neurovývojových manipulacích v glutamátergním systému

Neurovývojové manipulace v glutamátergním systému způsobené antagonisty NMDA receptorů ukázaly, že pokud jsou tyto látky aplikovány zvířatům během časných vývojových fází mozku, v dospělosti se u nich mohou objevit behaviorální změny podobné příznakům schizofrenie jako je hyperlokomoce, kognitivní deficit, špatné zpracování informací a zhoršení pracovní paměti a pozornosti (Lipska a Weinberger, 2000). Dále tyto nálezy podporuje fakt, že podání těchto látek – ketaminu a fencyklidinu v pozdním fetálním a časném postnatálním období života potkanů zvyšuje neuronální apoptotickou smrt (Ikonomidou et al., 1999). Ačkoliv mají tyto modely dobrou konstrukční validitu, neplatí to zcela o validitě fenomenologické. Spolehlivost některých těchto modelů se v dlouhodobém měřítku zdá diskutabilní vzhledem k poměrně slabé reprodukovatelnosti některých pozorování, především deficitu v prepulzní inhibici a lokomoci, které jsou zkoumány nejčastěji. Prediktivní validita těchto modelů je však uspokojivá, proto mají dobrý potenciál pro objev nových terapeutických cílů (Lim et al., 2012).

NMDA receptory regulují neuronální migraci a proliferaci. Období rychlého růstu a synaptogeneze je známo jako *growth spurts* a u odlišných druhů probíhá v různou dobu v závislosti na době narození. U hlodavců nastává během prvních tří týdnů po narození (Dobbing a Sands, 1979), zatímco u lidí od třetího trimestru do několika let po narození. Během této kritické vývojové periody v mozku probíhá nadprodukce neuronů a zároveň eliminace přibližně 50% všech spojení apoptotickou smrtí. Tím se modifikuje a zvyšuje účinnost synaptického přenosu (du Bois a Huang, 2007). U potkanů odpovídá vrchol exprese NMDA receptorů a vývoje mozku především prvním dvěma postnatálním týdnům. V tomto období je mozek citlivý na apoptotické poškození, které může být

navozeno antagonisty NMDA receptorů (Colwell et al., 1998). Ikonomidou a kolegové ukázali, že systémová aplikace MK-801 potkanům v dávce 0,5 mg/kg během PND 7 každých osm hodin působí v PND 8 rozsáhlou apoptózu. Ve stejné studii bylo také ukázáno, že efekt MK-801 závisí na výši injikované dávky, kdy vyšší dávky vyvolávají vyšší apoptotickou odpověď (Ikonomidou et al., 1999).

Pro potvrzení dobré funkce takto navozených animálních modelů jsou důležité i strukturní změny v podjednotkách NMDA receptorů, které se v dospělosti objevují po neonatální aplikaci jejich antagonistů. Po ní byla zjištěna snížená exprese podjednotky NR1 ve ventrálním hilu a její zvýšená exprese v hilu dorsálním (Harris et al., 2003), dále snížená exprese mRNA pro podjednotku NR2B v mozkové kůře (Sircar et al., 1996). Také se po perinatální aplikaci MK-801 prokázala zvýšená exprese především NR2A podjednotky v kortexu, hipokampu a striatu (Wilson et al., 1998). Změny v architektuře mozku byly pozorovány i u myšího animálního modelu. Časná postnatální aplikace 0,1 mg/kg MK-801 po dobu 15 dní vedla u těchto myší ke změně translace proteinů, tvorby synapsí a neuronálního vývoje a také ke zhoršení učení závislého na hipokampu, stejně jako lze pozorovat u schizofrenie (Elhardt et al., 2010).

Jednou z nejvíce charakterizovaných změn, navozenou neonatální aplikací MK-801 je zvýšená lokomoční aktivita. Zvýšená lokomoce koreluje s pozitivními symptomy a je přičítána hyperaktivitě mesolimbického dopaminového systému (Lim et al., 2012). Dokonce i mírná blokáda NMDA receptorů v neonatální periodě může vést ke specifickým lokomočním abnormalitám. Latysheva a Rayevsky pozorovali po aplikaci MK-801 v dávce 0,05 mg/kg hyperlokomoci u potkanů starých 16-28 dní. Tato zvířata také vykazovala zhoršené prostorové učení a vyšší anxiету. Navozené behaviorální poruchy se však zdají být pouze dočasné, jelikož od 16. týdne už u zvířat nebyly pozorovány (Latysheva a Rayevsky, 2003). Také se nepodařilo nalézt dlouhotrvající změny v lokomoční aktivitě u potkanů, kterým bylo PND 7-10 jednou denně aplikováno MK-801 v dávce 0,2 mg/kg. Nicméně když se tato aplikace provedla u zvířat, které byly následně chovány v izolaci, hyperlokomoce se u nich pozorovat dala (Lim et al., 2012). V jiné studii bylo potkanům kmene Wistar podáváno MK-801 v dávce 0,25 mg/kg PND 6-21 a v pozdějším věku u nich hyperlokomoce také pozorována nebyla, ale tato zvířata vykazovala nižší explorační chování v úloze vystavení se novému objektu, což může být interpretováno jako zvýšená anxieta, která se také řadí mezi schizofrenní příznaky (Baier et al., 2009).

Zdá se, že citlivost na tyto manipulace není tolik závislá na kmeni potkanů, ale spíše na pohlaví zvířat, protože samice se zdají být k těmto změnám citlivější. Bylo ukázáno, že aplikace MK-801 samicím kmene Sprague-Dawley od PND 5-14 působí hyperlokomoci v testu otevřeného pole (testování probíhalo v PND 42 a PND 77) (Guo et al., 2010). Toto zjištění potvrdila i studie Harrise a kolegů, kteří aplikovali potkaním samicím MK-801 v PND 7 a poté sledovali dlouhodobé změny, mezi kterými byl menší objem hipokampu, pozměněná exprese NR1 podjednotky, deficity v prepulzní inhibici a zvýšená lokomoční aktivita (Harris et al., 2003). Data další studie však ukázala, že potkani, kterým bylo během PND 6-21 aplikováno 0,25 mg/kg MK-801, vykazovali v dospělosti (PND 60)

sníženou lokomoční aktivitu v testu otevřeného pole (Schiffelholz et al., 2004). K podobným závěrům došel i Baier, který měřil nachozenou vzdálenost a dobu nehybnosti u 180 dní starých potkanů kmene Wistar ve vyvýšeném křížovém bludišti (EPM), po předchozí aplikaci MK-801 v PND 6-21. Zjistil, že jejich lokomoční aktivita byla snížena. Navíc analýza pomocí Western blotu ukázala trvalé zvýšení proteinu NMDA-R1 v kůře (Baier et al., 2009).

Výsledky ohledně dlouhodobých účinků navozených postnatální aplikací MK-801 na deficit v prepulzní inhibici (PPI) jsou v literatuře také rozporuplné. Jedna studie ukázala, že MK-801 v dávce 0,5 nebo 1 mg/kg aplikované v PND 3 nemá na PPI žádný efekt u potkanů, kteří byli testováni v 5. a 8. týdnu (Beninger et al., 2002). Naproti tomu jiná studie, ve které bylo potkanům čtyři dny (od PND 7 do PND 10) aplikováno MK-801 v dávkách 0,13 a 0,2 mg/kg zjistila efekty na PPI, které byly závislé na věku a dávce. Potkani, kteří byli testováni v PND 35 až 38 vykazovali v této úloze deficit, ale pouze ti, kterým bylo aplikováno 0,13 mg/kg MK-801, zatímco když probíhalo testování v pozdějším věku (PND 56 až 59), deficit vykazovali potkani, kterým byla aplikována pouze vyšší dávka MK-801 (0,2 mg/kg) (Uehara et al., 2009). Tyto závěry potvrdila další studie, která ukázala, že podávání MK-801 v dávce 0,2 mg/kg v PND 7-10 u potkanů narušuje prepulzní inhibici, pokud jsou testováni v PND 64 až 66 (Uehara et al., 2010). Všechny tyto deficity však byly pozorovatelné jen u studií, které využívaly potkany kmene Wistar.

4. Testování behaviorálních poruch v animálních modelech psychózy

Příčina vzniku kognitivního deficitu není zřejmá, ale u pacientů se schizofrenií byla popsána snížená glutamatergní neurotransmise, což by mohl být jeden z důležitých faktorů této nemoci (Kim et al., 1980). Na rozdíl od halucinací, bludů, či paranoidního chování, lze kognitivní zhoršení u animálních modelů psychózy pozorovat a testovat, což je významné z hlediska modelování tohoto onemocnění. Kromě toho můžeme u zvířat měřit změny v hladinách neurotransmiterů, cíleně poškozovat mozkové struktury nebo aplikovat určité látky a sledovat změny, které to způsobí.

V animálních modelech psychózy můžeme nejčastěji pozorovat hyperlokomoci, stereotypii, sníženou explorační aktivitu nebo narušení senzomotorického zpracování informací, které se testuje pomocí prepulzní inhibice úlekové reakce. Tento test je založen na měření velikosti úlekové reakce na nečekaný podnět (zvukový, nebo taktilní), která se měří velikostí motorické odpovědi. Pokud je těsně před hlavním podnětem aplikován jiný, slabší podnět - prepulz, dojde u zdravých jedinců k zeslabení úlekové reakce na následný silnější podnět. Deficit v tomto testu ukazuje neschopnost filtrovat mezi důležitými a nedůležitými podněty a projevuje se u schizofrenních pacientů i u jejich animálních modelů (Geyer et al., 2001).

Pro zjišťování deficitů v paměti a učení se u animálních modelů využívá testování prostorové paměti, která odpovídá vyšším kognitivním funkcím u lidí. Běžným testem pro tuto paměť je Morrisovo vodní bludiště (viz. kapitola 4. 2.), jehož zvládnutí závisí na hipokampu. Mezi další

schopnosti, které se u zvířat testují, a které jsou závislé na hipokampu patří kognitivní koordinace, která má u lidí i zvířat význam v rozlišování relevantních a irrelevantních pojmů a stimulů. Narušení kognitivní koordinace se projevuje také u schizofrenie jako desorganizace myšlení a bývá spojováno s halucinacemi (Phillips a Silverstein, 2003). Pro její testování se používá test aktivního vyhýbání se místu na rotující aréně (viz. kapitola 4.3.).

4.1. Vyvýšené křížové bludiště

Vyvýšené křížové bludiště (angl. *elevated-plus maze*; EPM) je nepochybně jedním z nejpoužívanějších testů pro zjišťování anxiety u animálních modelů. Úzkost (anxieta) je emoce, kterou člověk nebo zvíře reaguje na pocity ohrožení nebo nejistoty, a které se účastní i NMDA receptory ventrálního hipokampu (Barkus et al., 2010). EPM je čtyřramenné bludiště ve tvaru kříže, umístěné 40-50 cm nad podlahou. Dvě jeho ramena jsou uzavřená, je kolem nich vysoké hnědé neprůhledné plexisklo, a zbylá dvě protilehlá ramena jsou otevřená, mají dole pouze lištu, aby z bludiště zvířata nepadala. Uprostřed bludiště jsou ramena spojena plošinkou, která umožňuje procházení zvířat z ramene do ramene. Test je založen na přirozené averzi potkanů k vysokým, otevřeným prostorům a konfliktu mezi strachem z neznámého prostoru a motivací prostředí prozkoumat. Pokud se tedy bludiště skládá z otevřených a uzavřených ramen, tak intaktní potkani explorují a tráví více času v ramenech uzavřených a otevřeným se spíše vyhýbají (Walf a Frye, 2007).

Test spočívá v umístění potkana na centrální plošinu, hlavou směrem do otevřeného prostoru, kde je poté ponechán několik minut k volnému pohybu a exploraci na bludišti. Sledují a měří se parametry jako jeho aktivita, čas, který potkan stráví v jednotlivých ramenech a počet vstupů do nich. Celkový počet vstupů do ramen odráží pohybovou aktivitu potkana. Také je možno hodnotit další chování jako například vzpřimování těla, nahlížení do otevřených ramen (*risk assesment*) nebo vyklánění se z těchto otevřených ramen (*head-dipping*). Pokud potkan tráví méně času v otevřených ramenech nebo pokud má do nich výrazně méně vstupů, můžeme říci, že se u něj projevilo úzkostné chování. Signifikantní nárůst v procentech času stráveného v otevřených ramenech a počet vstupů do nich byl pozorován po benzodiazepinových a barbiturátových anxiolytikách, což jsou látky odstraňující úzkost (chlordiazepoxid, diazepam, fenobarbital). Sloučeniny, které u člověka úzkost zvyšují, jako je yohimbin, pentylentetrazol, kofein, amfetamin, naopak snižují procento času stráveného v ramenech otevřených (Pellow et al., 1985). Zdraví potkani se otevřeným ramenům vyhýbají, protože je tyto otevřené prostory stresují. Pro strachové a úzkostné chování je důležitá především role ventrálního hipokampu. Ukázalo se, že potkani s lézí ventrálního hipokampu trávili více času v otevřených ramenech, a měli i nižší hladinu stresového hormonu kortikosteronu v krvi. U potkanů s lézí dorsálního hipokampu se však takovéto změny neprojevily (Kjelstrup et al., 2002). Také

bylo zjištěno, že ketamin v dávce 50 mg/kg u potkanů v EPM potlačuje úzkost (Engin et al., 2009) a anxiolytické účinky má také MK-801 (Fraser et al., 1996).

Tento test se stal oblíbeným jednak pro svou jednoduchost a jednak pro to, že všechny měřené parametry jsou dobře interpretovatelné. Je validní jako animální model pro testování anxiety jak u myší, tak potkanů. Dále se využívá pro výzkum anxiolytik a také může být použit i pro studium učení. Itoh s kolegy prokázal, že latence, což je čas, který potkan potřebuje pro přesun z otevřeného ramene do uzavřeného, se zkracuje, pokud zvíře již otevřené rameno předtím navštívilo. Pokud tedy potkan během první expozice získá panický strach z otevřeného prostoru, zachová si po nějaký čas v mozku tuto silnou paměťovou stopu, a do uzavřeného ramene se přesune rychleji (Itoh et al., 1991).

4.2. Morrisovo vodní bludiště

Kognitivní aspekt, který se zdá být neonatální aplikací MK-801 nejvíce ovlivněn, je prostorová paměť. Jedním z testů, který tuto paměť zkoumá, je Morrisovo vodní bludiště (*Morris water maze*; MWM). V tomto testu je potkan umístěn do kruhového bazénku naplněného vodou, která je zakalená netoxickou bílou barvou a jeho úkolem je nalézt kruhový ostrůvek ukrytý pod hladinou na základě vodítek kolem bazénu. Ostrůvek bývá umístěn doprostřed některého kvadrantu. Pohyb zvířete a jeho uplavaná dráha se zaznamenává přes počítačový program, který je propojen s kamerou nad středem bazénku. Jedna plavba obvykle skončí, pokud potkan ostrůvek nalezne, nebo po uplynutí definované doby (60s), po které je na ostrůvek naveden. Každý potkan plavbu opakuje několikrát, podle toho jaký typ experimentu se zrovna provádí. Tento test je unikátní v tom, že všechna proximální vodítka (jako pachové značky) jsou skryta, a k lokalizaci skrytého ostrůvku potkan může použít pouze značky kolem bazénu. Chování potkanů v MWM může být hodnoceno na základě mnoha kritérií. Kromě latence, což je čas potřebný k nalezení ostrůvku, lze hodnotit rychlost plavání, délku uplavané dráhy nebo thigmotaxi (Morris, 1981; Morris, 1984).

Existují různé modifikace MWM. Jedna z nich je testem dlouhodobé paměti, kdy má ostrůvek stejnou polohu každý den během celého experimentu a potkan je na každou plavbu vypouštěn z jiné startovní pozice na okraji bazénku (Morris, 1981). Byla také vytvořena modifikace testu pro pracovní paměť, nazývaná *delayed-matching-to place* (DMP). Od předchozí verze se liší tím, že poloha ostrůvku zůstává stejná pouze během dne a každý další den v průběhu experimentu se mění. Startovní pozice se mění taktéž. Při první plavbě najde zvíře ostrůvek náhodou nebo je na něj navedeno, a druhá plavba již odráží schopnost pracovat s krátkodobým ukládáním informací. DMP je test, který je závislý na hipokampu, a zvířata s hipokampální lézí nejsou schopna tento úkol řešit (Steele a Morris, 1999). Bilaterální léze hipokampu výrazně zhoršují schopnosti potkanů v této úloze, a celkově je MWM na poškození hipokampu citlivé (Morris et al., 1982). Bylo také zjištěno, že po aplikaci MK-801 potkanům zabere více času skrytý ostrůvek najít a tento čas koreluje s množstvím látky, jaké jim bylo aplikováno (van der Staay et al., 2011). Gorter s kolegy ukázali, že potkani, kterým bylo v PND

8-19 aplikováno MK-801, jsou sice schopni se úkol v MWM naučit, ale mnohem pomaleji než kontrolní zvířata (Gorter a de Bruin, 1992). Také další studie prokázala, že potkani, kterým vědci 2x denně aplikovali 0,1 mg/kg MK-801 v PND 7-19 vykazovali mírné zhoršení v MWM v PND 90-102 (Németh et al., 2002). Jiná studie zjistila, že MK-801 ve vysokých dávkách (0,25-10 mg/kg) vyvolává u experimentálních zvířat ospalost a akinezi, poruchu příjmu potravy, zhoršenou lokomoci a navigaci ke skrytému ostrůvku v MWM, a že tyto deficity vymizí 3-5 dní po injekci (Whishaw a Auer, 1989). Další studie ukázala, že potkani po aplikaci vysokých dávek MK-801 (10 mg/kg) nacházejí skrytý ostrůvek v MWM pomaleji než kontrolní skupiny a že v nich tato dávka vyvolává thigmotaxi (Lukoyanov a Paula-Barbosa, 2000).

4.3. Aktivní vyhýbání se místu s přeučením na rotující aréně

Aktivní vyhýbání se místu je jedna z modifikovaných verzí úlohy vyhýbání se místu, která se někdy využívá pro testování kognitivní koordinace (Bures et al., 1997; Fenton et al., 1998). Základem pro tento test je umístění potkana na otáčející se kruhovou arénu (*Carousel*), na které je definovaný zakázaný sektor, do něhož by zvíře nemělo vstupovat. Pokud do něj potkan vstoupí, je potrestán mírnou elektrickou rankou. Tento test je založen jednak na přirozeném exploračním chování potkanů a jednak na předpokladu, že pokud potkan dostane na svoji přirozenou reakci averzivní stimul, bude mít tendenci tuto reakci a chování potlačovat (Stuchlik, 2004b). Zakázaný sektor může být definován dvojím způsobem, a to buď vzhledem ke stabilním orientačním bodům v místnosti (*room frame*), kdy se potkan musí orientovat díky distálním orientačním bodům a využívat tedy alotetickou formu navigace. Nebo vzhledem k orientačním bodům v rámci arény (*arena frame*), kdy se potkan orientuje podle proximálních bodů, jako jsou informace z proprioreceptorů a pachové stopy na aréně. Jelikož se aréna otáčí, dochází k rozdělení informací z referenčních rámců arény a místnosti a pro úspěšné řešení této úlohy musí potkan rozpoznat jaký referenční rámec je relevantní. Pokud je sektor definován v rámci místnosti, nesmí potkan pokládat za důležité orientační body na aréně a naopak (Stuchlik, 2003; Wesierska et al., 2005; Kubík a Fenton, 2005).

Aktivní vyhýbání se místu s přeučením na rotující aréně je tedy varianta tohoto testu, kdy je zakázaný sektor stabilní v rámci místnosti a nepohybuje se společně s arénou. Pokud potkan sedí a na aréně se nepohybuje, neustále je do zakázaného sektoru dovážen rotací arény. Potkani si k řešení této úlohy většinou vyvinou několik strategií, jako je pohybování se proti směru rotace arény nebo rychlé proběhnutí zakázaným sektorem. Při tomto úkolu se nejčastěji hodnotí počet vstupů potkana do zakázaného sektoru, což odráží jak je schopen tuto úlohu řešit. Počet šoků, které v zakázaném sektoru potkan dostane za celé sezení, reflektuje jeho schopnost vybavit si unikovou reakci. Mezi další sledované parametry patří maximální čas mezi dvěma vstupy do zakázaného sektoru, který vypovídá o úspěšnosti zvířat vyhýbat se. Časová latence, po které potkan do sektoru prvně vstoupí, má význam

pro testování dlouhodobé paměti, jelikož ukazuje, zda si potkan pamatuje zakázanou oblast z předešlých dní. Celková nachozená dráha na aréně vypovídá o tom, zda potkan nebyl hyperaktivní nebo naopak nečinný. Hyperaktivitu mohou vyvolat některé farmaka, a i když budou kognitivní schopnosti potkana v pořádku, stejně nebude schopen úlohu úspěšně vyřešit (Stuchlik, 2004b).

Úspěšné vyřešení této úlohy závisí také na intaktním hipokampu. Výsledky studie Cimadevilly a kolegů ukázaly, že zvířata po oboustranné inaktivaci dorsálního hipokampu tetrodotoxinem mají signifikantně zvýšený počet vstupů do zakázaného sektoru (Cimadevilla et al., 2000). Výsledky jiného výzkumu přinesly zjištění, že i jednostranná inaktivace hipokampu poškozuje schopnost naučit se tuto úlohu a i vybavit si již naučené informace (Cimadevilla et al., 2001). Další studie ukázala, že také MK-801 zhoršuje výsledky potkanů v této úloze, a to v dávkách 0,15 mg/kg a 0,2 mg/kg (Stuchlik a Vales, 2005).

4.4. Experimentální psychóza navozená antagonisty NMDA receptorů

Experimentální psychóza, která je nejpodobnější schizofrennímu onemocnění z důvodu navození jak pozitivních, tak i negativních příznaků využívá akutní nebo chronické aplikace non-kompetitivních antagonistů NMDA receptorů (ketaminu, PCP, MK-801) (Jentsch et al., 1998). Tyto látky zhoršují výsledky experimentálních zvířat v kognitivních úlohách, které se po jejich aplikaci dají v testech pozorovat jako např. zhoršená paměť. Dávky MK-801 do 0,1 mg/kg u potkanů zároveň s kognitivním zhoršením nevyvolávají další zásadní změny v chování, které by mohly ovlivňovat výsledky. Nicméně rozmezí dávek, které pouze zhoršují kognitivní schopnosti a nepůsobí další senzorické, lokomoční nebo toxikologické vedlejší účinky, je úzké (van der Staay et al., 2011). Subchronická aplikace vysokých dávek MK-801 (nad 10 mg/kg) působí buněčnou smrt a degeneraci (nazvanou Olneyho léze) v řadě mozkových struktur jako například *gyrus dentatus* a retrosplenální a entorhinální kortex (Bender et al., 2010). Výsledky a poškození, které u animálních modelů aplikace MK-801 vyvolává, závisí nejenom na dávce a aplikaci (akutní, či subchronická), ale i na způsobu podání (perorální, subkutánní, intraperitoneální), na typu zvířete (myš, potkan), kmeni potkanů (Wistar, Long-Evans, Sprague-Dawley, Fisher) a i na pohlaví. Také záleží na tom, v jaké behaviorální úloze je zvíře testováno. A v poslední řadě na věku, ve kterém byla zvířeti látka aplikována.

4.4.1. Akutní aplikace antagonistů NMDA receptorů

Po akutním podání antagonistů NMDA receptorů lze pozorovat velké změny v hladinách neurotransmiterů, které mají za následek změny v chování jako je zhoršená pracovní paměť, deficity v prepulzní inhibici úlekové reakce, zhoršené sociální interakce, hyperlokomoce nebo stereotypní chování (Bubeníková-Valesová et al., 2008). V PFC bylo po akutním podání PCP zjištěno zvýšení extracelulárních hladin dopaminu, acetylcholinu a glutamátu (O'Donnell a Grace, 1998).

Hyperlokomoce a stereotypní chování lze po aplikaci 25 mg/kg ketaminu pozorovat už po 5 minutách a trvá zhruba 40 minut (Razoux et al., 2007). Závislost věku potkanů a dávky ketaminu na vyvolaných schizofrenních příznacích zkoumala studie Wilsona a kolegů. Aplikovali ketamin potkanům ve třech věkových skupinách, a to 22, 35, a 50 dnů starým. Testovali je v testu otevřeného pole na hyperlokomoci a hyperaktivitu. Ketamin vyvolal hyperaktivitu u obou pohlaví ve věku 22 dní, ale pouze u samic 35 dní starých. Ve skupině 50 dní starých potkanů nevyvolával žádné efekty, bez ohledu na pohlaví. Psychotomimetické účinky ketaminu zde byly pozorovány jako neobvyklé typy chování u potkanů – otočky, úkroky vzad a pohybování hlavou ze strany na stranu (Wilson et al., 2007). Jelikož jsou změny v chování po aplikaci ketaminu spíše přechodné, než dlouhodobé, je tento model vhodnější pro testování akutní psychózy než dlouhodobějších deficitů. Chronické dávky ketaminu, které by mohly potencionálně lépe modelovat schizofrenii, naráží na problém rozvoje tolerance při jeho opakovaném podávání (Pouget et al., 2010).

Po akutní aplikaci MK-801 se první behaviorální abnormality dají pozorovat 20-25 minut od injekce a výraznější jsou tyto změny u samic pravděpodobně díky tomu, že MK-801 má v samičích játrech menší metabolizační kapacitu, která má za následek až 25x vyšší koncentrace MK-801 v séru a mozku, čímž je u nich účinnější (Andiné et al., 1999). Hyperlokomoce je po akutní aplikaci MK-801 pozorovatelná jak u myších animálních modelů (v dávce 0,60 mg/kg) (Zuo et al., 2006), tak u studií, které využívají potkany různých kmenů a MK-801 různých dávek. Toto chování bylo pozorováno po dávce 0,40 mg/kg (Zajackowski et al., 2003), 0,30 mg/kg (Vales et al., 2006) i 0,20 mg/kg (Stuchlik a Vales, 2005). Dále byly po akutní aplikaci MK-801 v dávce 0,20 mg/kg u potkanů kmene Long-Evans zjištěny problémy při učení v úloze aktivního vyhýbání se místu. V MWM byl pozorován deficit učení již při nižší dávce (0,10 mg/kg) a při vyšších dávkách zvířata tuto úlohu vůbec nezvládala řešit (Stuchlik et al., 2004a). Jiná studie zkoumala v animálním modelu psychózy navozené akutní aplikací MK-801 jeho vliv na behaviorální flexibilitu, což je schopnost adaptovat se na změny v prostředí, která je u schizofrenních pacientů většinou snižena. Probíhalo testování v MWM i na aréně, a to v podmínkách přeučení, tedy po změně umístění ostrůvku/zakázaného sektoru. Bylo zjištěno zhoršení v obou testech v rozmezí dávek 0,10–0,15 mg/kg, ale úloha aktivního vyhýbání se místu se na tyto změny ukázala být citlivější (Lobellova et al., 2013). V kontrastu s touto studií je ale jiná, která také

porovnávala výkony potkanů po aplikaci MK-801 (dávky 0,1 a 0,2 mg/kg) v těchto úlohách. Ukázalo se, že obě dávky zhoršují výkony v MWM, ale pouze vyšší dávka (0,2 mg/kg) narušovala výkony v úloze aktivního vyhýbání se místu, tudíž se v této studii prokázalo MWM na MK-801 navozené změny citlivější (Stuchlik et al., 2004a). Byl také porovnáván efekt aplikace MK-801 na výkon v úloze aktivního vyhýbání se místu a v modifikované verzi MWM zaměřené na pracovní paměť a to u potkanů kmene Wistar a Long-Evans. Potkani kmene Wistar, kterým bylo aplikováno MK-801 v dávce 0,1 mg/kg vykazovali kognitivní deficit na aréně bez signifikantní hyperlokomoce, zatímco jejich výkony v MWM zhoršeny nebyly. Potkani kmene Long-Evans, jimž byla aplikována stejná dávka MK-801, nevykazovali zhoršení ani v jednom testu, a hyperlokomoce společně s neschopností řešit oba úkoly se prokázala u obou kmenů až ve vyšších dávkách MK-801 (0,2 a 0,3 mg/kg). Tyto výsledky naznačují, že potkani kmene Wistar jsou na kognitivní deficit navozený aplikací MK-801 citlivější (Vales et al., 2006).

4.4.2. Chronická aplikace antagonistů NMDA receptorů

Ačkoliv jsou akutní studie schopné napodobit některé aspekty schizofrenie, modelovat chronickou psychózu a přetrvávající kognitivní deficit bohužel nedovedou, a jsou proto ve své použitelnosti poněkud omezeny. Cílem dalších studií je spíše zaměření se na chronickou aplikaci MK-801, PCP a ketaminu hlodavcům a pozorování dlouhodobějších změn v chování a neurotransmisí.

	Akutní aplikace antagonistů NMDA receptorů	Chronická aplikace antagonistů NMDA receptorů
Glutamátergní systém	Zvýšení hladin glutamátu v PFC	Snížení hladin glutamátu a zvýšení hladin glutaminu v PFC
Dopaminergní systém	Zvýšení hladin dopaminu v PFC	Menší produkce a utilizace dopaminu
GABAergní systém	Menší uvolňování GABA	Snížení exprese GAD67 a menší počet parvalbumin pozitivních neuronů
Behaviorální změny	Hyperlokomoce	Zvýšení pohybové aktivity navozené stresem a amfetaminem
	Deficit ve zpracování informací	Horší výkony v kognitivních testech
	Horší prostorová pracovní paměť, exekutivní funkce	---
	Menší sociální interakce	Menší sociální interakce
	Stereotypní chování	Stereotypní chování

Tabulka č. 2. Porovnání změn v chování a neurotransmitterových systémech po akutní a chronické aplikaci antagonistů NMDA receptorů (převzato a upraveno z Bubeníková-Valesová et al., 2008).

Chronická aplikace MK-801 působí u potkanů snížení extracelulárních hladin glutamátu ve frontální oblasti mozku (Zuo et al., 2006), po čtrnácti denní aplikaci PCP byla u opic pozorována menší produkce a utilizace dopaminu v PFC (Jentsch et al., 1997), a chronická aplikace PCP také působí menší utilizaci glukózy v thalamu a PFC, což lze pozorovat i u pacientů se schizofrenií (Lehrer et al., 2005). To, že subchronická aplikace PCP vyvolává přetrvávající kognitivní deficit, který může být zlepšen léčbou atypickými, ale ne klasickými antipsychotiky, navrhli a testovali ve své studii i Abdul-Monim s kolegy. Samice potkanů byly naučeny vykonávat jednoduchý úkol, a poté co v něm dosáhly úspěšnosti 90%, jim byl 2x denně aplikován PCP v dávce 2 mg/kg po dobu 7 dní. Po dalších sedmi dnech probíhalo opětovné testování jejich kognitivních schopností a bylo zjištěno, že jejich výkony se signifikantně zhoršily. Po aplikaci ziprasidonu (2,5 mg/kg), olanzapinu (1,5 mg/kg) a klozapinu (5 mg/kg) se jejich výkony opět zlepšily, což ale nebylo pozorováno po aplikaci klasických antipsychotik - haloperidolu (0,05 mg/kg) a chlorpromazinu (2 mg/kg) (Abdul-Monim et al., 2006). Právě fakt, že hyperlokomoci, stereotypii nebo ataxii vyvolanou non-kompetitivními antagonisty NMDA receptorů, zmírňují antipsychotika, podporuje myšlenku, že je tento model pro navození psychózy relevantní (Andiné et al., 1999).

Praktická část

5. Cíle diplomové práce

V této práci jsme využili MK-801, non-kompetitivního antagonisty NMDA receptorů, který je schopen navodit u animálních modelů široké spektrum příznaků podobných lidské schizofrenii, jako je například kognitivní zhoršení a experimentální psychóza.

Řada studií se zabývala akutními účinky MK-801 na chování laboratorních potkanů s cílem modelovat psychózu, avšak jen málo experimentů se zajímalo o dlouhodobé účinky této látky testované s delším časovým odstupem. Vzhledem k tomu, že v literatuře není dostatek údajů o vlivu dlouhodobě podávaného MK-801 zejména potkanům v adolescenci a v rané dospělosti, rozhodli jsme se v této práci zaměřit na změny, které lze pozorovat po dvoutýdenní subchronické aplikaci MK-801 u laboratorních potkanů v těchto časových obdobích. Zajímaly nás nejen změny chování, ale také možné abnormality v morfologii hipokampu.

Cíle této diplomové práce byly následující:

- 1) Sledovat změny v neurobehaviorálních funkcích po dvoutýdenním subchronickém vystavením MK-801 a po odeznění jeho účinků. Porovnat tyto změny v rámci potkanů z kmene Wistar a Long-Evans s počátkem aplikace ve věku 30 a 60 dnů.
- 2) Zjistit, k jakým změnám dochází po této experimentální manipulaci v expresi podjednotek NMDA receptorů, a to konkrétně NR1, NR2A a NR2B.
- 3) Zhodnotit, zdali tato manipulace představuje validní, spolehlivý a prakticky použitelný animální model schizofrenii-podobného chování u obou outbredních kmenů potkanů.

6. Materiál a metody

6.1. Zvířata

Pro tento výzkum jsme použili samce potkanů kmenů Wistar (32 jedinců) a Long-Evans (40 jedinců), pocházející z chovů Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i., ve věku PND 30 a PND 60. Byli chováni ve skupinách 2-4 jedinců v průhledných plastových boxech o rozměrech 25 x 30 x 40 cm s kovovým mřížovým víkem a volným přístupem k vodě a potravě. Boxy byly umístěny v klimatizované místnosti s konstantní teplotou, vlhkostí a pravidelným světelným režimem 12 hodin světlo, 12 hodin tma. Zvířata byla denně monitorována, čištění klecí a doplňování potravy a vody probíhalo obden. Všechny experimenty probíhaly ve světelné části dne a byly provedeny v souladu se schváleným projektem pokusů (č. j. 136/2013), se zákonem č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a podle direktiv rady Evropské Unie (2010/63/EC).

6.2. Chemikálie

Potkanům, kteří sloužili jako kontrolní skupiny, byl subkutánně aplikován sterilní fyziologický roztok v dávce 1 ml/kg. Ostatním experimentálním skupinám potkanů bylo subkutánně podáváno MK-801 (dodavatel SigmaAldrich s.r.o., Česká republika), rozpuštěné ve fyziologickém roztoku v koncentraci 0,5 mg/kg. Injekce byly podávány denně, mezi 10:00 – 11:00 hodinou, po dobu 14 po sobě jdoucích dní (viz kapitola 6.3.)

Na analýzu podjednotek NMDA receptorů Western bloty byly použity následující chemikálie: diethylether (Penta, Czech Republic), PBS, pH 7.4 (#79382, SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA), inhibitor proteáz (#P8340, SigmaAldrich, USA), *Laemmli loading pufr* (#161-0737, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), *Tris-buffered saline with Tween*: 0,05M Tris [pH 7.4], 0,1M NaCl, a 0,05% [v/v] Tween 20, primární protilátka anti-NR1 (NeuroMab clone N308/48), primární protilátka anti-NR2A (NeuroMab clone N327/95), primární protilátka anti-NR2B (NeuroMab clone N59/36), sekundární anti-mouse protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (#115-035-174, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, USA) a *WestFemto SuperSignal* chemiluminiscenční substrát (#34096, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

6.3. Design experimentu

V tomto pokusu byly použity dva kmeny potkanů a čtyři kohorty zvířat. V každém kmeni (Wistar a Long-Evans) byly stanoveny dvě kohorty: první byl aplikován fyziologický roztok nebo MK-801 ve věku PND 30 (= kohorta PND 30), a druhá kohorta dostávala fyziologický roztok nebo MK-801 od PND 60 (= kohorta PND 60). V rámci každé kohorty byly dále dvě skupiny, experimentální, která byla vystavena působení MK-801 (buď od PND 30, nebo PND 60), a kontrolní,

kteřá dostávala fyziologický roztok. Každá skupina se skládala z deseti zvířat pro každou kohortu u kmene Long-Evans, a z osmi zvířat pro každou kohortu u kmene potkanů Wistar. Injekce byly potkanům aplikovány denně, 14 po sobě jdoucích dnů, s intervalem 24 hodin. Po dokončení těchto injekcí byla zvířata 5 dní ponechána v klidu v boxech, aby si odpočinula a došlo u nich ke stabilizaci chování a vymytí látky. Následně byly provedeny behaviorální testy. Jednodenní testování ve vyvýšeném křížovém bludišti (EPM) začalo v PND 49 u kohorty PND 30 a v PND 78 u kohorty PND 60. *Delayed-matching-to-place* (DMP) verze Morrisova vodního bludiště začala v PND 50 u kohorty PND 30 a PND 79 u kohorty PND 60. Tento test byl prováděn po dobu 10 dní. Aktivní vyhýbání se místu s přeucením na rotující aréně, které probíhalo také 10 za sebou jdoucích dní, začalo u kohorty PND 30 v PND 60 a u kohorty PND 60 v PND 89. Před testováním na aréně byla potkanům jemně implantována hypodermální jehla, a to propíchnutím kožní řasy na jejich zádech. Ostrý konec jehly byl otupen a stočen do smyčky, aby se zabránilo jejímu vypadnutí. Přes tuto jehlu zvířata dostávala elektrické šoky na aréně (viz kapitola 6.4.3.). Tato manipulace odpovídá subkutánní injekci u lidí a nevyžaduje anestezii zvířat.

Typy manipulace a experimentů	Doba trvání testů	kmen Wistar		kmen Long-Evans	
		Kohorta PND 30	Kohorta PND 60	Kohorta PND 30	Kohorta PND 60
		PND zahájení testu		PND zahájení testu	
Aplikace 0,5 mg/kg MK-801 / fyziologického roztoku	14 dní	PND 30	PND 60	PND 30	PND 60
Odpočinek	5 dní				
Vyvýšené křížové bludiště	1 den	PND 49	PND 78	PND 49	PND 78
Morrisovo vodní bludiště	10 dní	PND 50	PND 79	PND 50	PND 79
Aktivní vyhýbání se místu s přeucením na rotující aréně	5 dní osvojení 5 dní přeucení	PND 60	PND 89	PND 60	PND 89

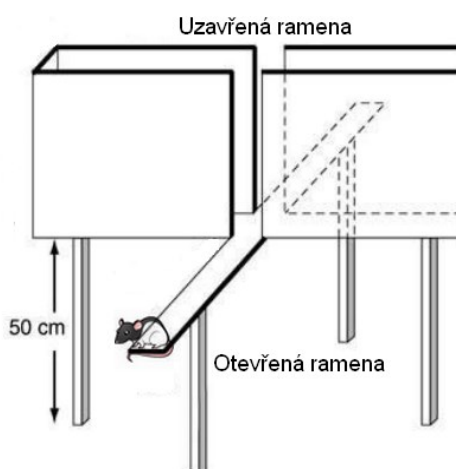
Tabulka č. 3. Design experimentu. Rozdělení potkanů do skupin, kohort, a doba a trvání jednotlivých manipulací.

Po dokončení behaviorálních testů byla zvířata usmrcena a jejich mozková tkáň byla připravena pro analýzu změn v hladinách NR1, NR2A a NR2B podjednotek NMDA receptorů pomocí Western blotů (viz kapitola 6.5.).

6.4. Behaviorální testování

6.4.1. Vyvýšené křížové bludiště

Pro vyvýšené křížové bludiště byla použita standardní aparatura, tedy bludiště ve tvaru kříže, s dvěma rameny obklopenými vysokými stěnami (uzavřená ramena) a dvěma bez nich (otevřená ramena), vyvýšené zhruba 1 m nad podlahu (viz obr. č. 3). Aparatura byla umístěna v tiché a mírně osvětlené experimentální místnosti. Každý potkan absolvoval sezení v délce pěti minut, kdy byl ponechán v bludišti a kde byl snímán webovou HD kamerou. Následně byl z těchto záznamů programem *Ethowatcher* (Noldus) vyhodnocen čas strávený na centrální platformě a v otevřených a uzavřených ramenech, a počet vstupů do každého z nich.



Obr. č. 3. Vyvýšené křížové bludiště (převzato a upraveno z File et al., 2004).

6.4.2. DMP verze Morrisova vodního bludiště











Morrisovo vodní bludiště tvořil kruhový bazén o průměru 180 cm a výšce 50cm, který byl naplněn vodou o teplotě 22 ± 2 °C a zakalen bílou netoxickou barvou (Primalex, PPG Deco Czech a.s., Česká republika; viz obr. č. 4).



Obr. č. 4. Schematický náčrt Morrisova vodního bludiště. © Markéta Svojanovská

K behaviorálnímu testování byla použita DMP verze MWM, která je testem učení prostorové reprezentace na jeden pokus (Steele a Morris, 1999) a umožňuje studovat prostorovou pracovní paměť

a persistenci paměťové stopy již po jedné plavbě. Tento experiment využíval verzi pro pracovní paměť s krátkými 15-s intervaly mezi jednotlivými plavbami (angl. *inter-trial interval*; *ITI*). Test probíhal po dobu 10 dní a každé sezení se skládalo ze čtyř plaveb (trialů). Uprostřed jednoho z pomyslných kvadrantů bazénku byl ve vodě umístěn skrytý průhledný ostrůvek z plexiskla ve tvaru válce o průměru 10 cm. Jeho pozice se denně měnila v pseudonáhodném pořadí, avšak v rámci jednoho dne zůstávala stejná. Potkani byli vypouštěni z různých pozic od kraje bazénu, které se náhodně měnily také každý den a zároveň každou plavbu (viz tabulka č. 4). Pokud potkan do 60 sekund skrytý ostrůvek nenašel, byl na něj lehce naveden experimentátorem. Pohyb a uplavaná dráha potkanů byla sledována, digitalizována a zaznamenávána programem Tracker (Biosignal Group, USA) kamerou umístěnou nad středem bazénu.

	Dny	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
Poloha ostrůvku		JV	SV	JZ	SZ	J	SV	JZ	JV	SZ	SV
											
Startovací pozice potkanů	T1	J	SZ	SV	V	JV	JZ	JZ	JZ	Z	JV
	T2	V	SV	V	JZ	V	J	JV	JV	S	Z
	T3	SV	S	SZ	Z	SV	S	SV	Z	SZ	SV
	T4	JV	Z	Z	JV	SZ	Z	V	SZ	J	JZ

Tabulka č. 4. Design experimentu MWM. Popis jednotlivých, arbitrárně určených světových stran (S-sever, J-jih, V-východ, Z-západ), v jejichž kvadrantech byl umístěn skrytý ostrůvek a zároveň startovních pozic, ze kterých byli v jednotlivých dnech (D1 – D10) vypouštěni potkani na své plavby (T1 – T4).

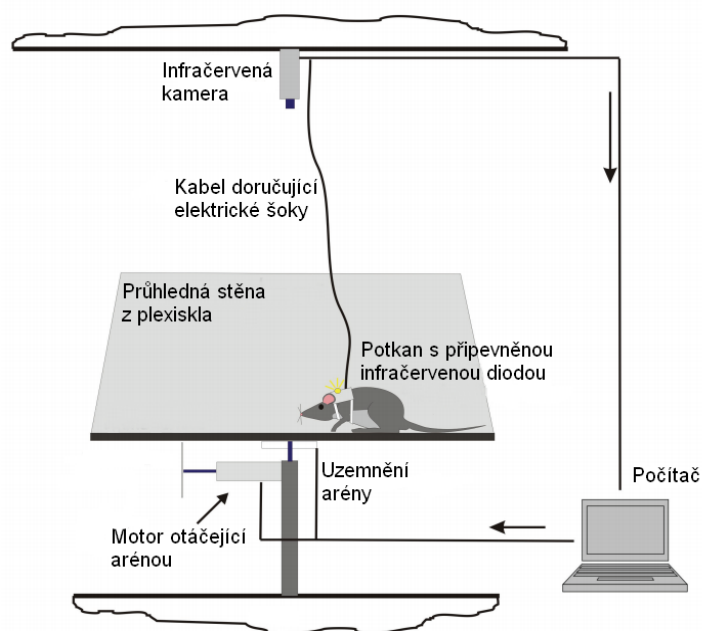
6.4.3. Aktivní vyhýbání se místu s přeučením na rotující aréně

Aparatura pro úlohu aktivního vyhýbání se místu se skládala z hladké kruhové kovové arény o průměru 82 cm, obklopené průhledným plexisklem a umístěné zhruba 1 m nad podlahou. Celou arénu poháněl elektromotor, který byl pod ní. Nad arénou byla umístěna kamera, snímající signál dvou infračervených LED-diod, a to referenční, umístěné na okraji arény, a sledovací, upevněné na malém postrojku na zádech potkana. Tato kamera byla propojena se sledovacím programem (Tracker, Biosignal Group, USA), který snímal polohu potkana v 25-ms intervalech a zaznamenával jí do systému kartézských souřadnic na pevný disk v počítači, dále jeho pohyb a rychlost, a který také udílel potkanům elektrické šoky (viz obr. č. 5).

Na začátku každého sezení byl potkan umístěn do arény, která se konstantně otáčela rychlostí 1 otočení za minutu. V rámci souřadnicového systému místnosti byl definován 60° zakázaný sektor, který byl pro potkany na aréně neviditelný, a jeho polohu mohla zvířata určit jen podle prostorového vztahu s okolními orientačními body v místnosti, jako jsou dveře, závěsy, apod.

Potkani měli za úkol se polohu zakázaného sektoru naučit a nevstupovat do něj. Každý vstup do zakázaného sektoru, který trval déle než 300 ms, byl potrestán mírnou elektrickou rankou (opakování každých 1200 ms, dokud potkan sektor neopustil). Intenzita ranky byla individuálně upravena pro každé zvíře (0,2 - 0,6 mA), aby byla zajištěna úniková reakce a zároveň se vyhnulo strachové strnulosti (angl. *freezing*). Ranky potkani dostávali přes kabel, který byl připevněn k postroji na jejich zádech a spojen s vodivým podkožním implantátem s nízkým odporem, který jim byl zaveden dříve, a přes uzemněnou vodivou podlahu arény. Trajektorie potkanů byly zdigitalizovány a zaznamenány na počítačový program, který následně umožnil off-line rekonstrukci a analýzu, a to jak v rámci souřadnicového systému místnosti, tak rotující arény (Carousel Maze Manager, Bahnik, 2014).

Tato úloha klade ve srovnání s MWM nižší nároky na přesné prostorové znázornění, ale na druhé straně vyžaduje segregaci prostorových rámců, dovednost, která je považována za rovnocennou k lidské kognitivní koordinaci (Wesierska et al., 2005). Testování na aréně probíhalo celkem deset dní a každé sezení trvalo 20 minut, ITI = 24hod. Prvních pět dní byl test navržen jako fáze osvojení, kdy byl zakázaný sektor umístěn na arbitrárním severu. Následovalo pět dní fáze přeučení, kdy se pozice zakázaného sektoru posunula o 180° (na arbitrární jih arénky). Tato přeučovací fáze je citlivá na zhoršení kognitivní flexibility. Poloha zakázaného sektoru tedy zůstávala vždy pět dní stejná, proto mohla být tato úloha využita i jako test dlouhodobé paměti potkanů. Testování probíhalo v denních hodinách (10:00 – 18:00).



Obr. č. 5. Schéma aparatury pro úlohu aktivního vyhýbání se místu (převzato a upraveno ze Stuchlik et al., 2013).

6.5. Biochemická analýza – Western blot

Po ukončení behaviorálních testů následovala ve věku cca 4 měsíců biochemická analýza hipokampální tkáně pomocí Western blotů. Tato analýza se soustředila na změny v expresi NR1, NR2A a NR2B podjednotek NMDA receptorů v hipokampu potkanů.

Potkani obou kmenů byli dekapitováni po inhalační anestezii diethyletherem (Penta, Czech Republic) a byla jim odebrána mozková tkáň z hipokampu. Tkáň byla zamražena a uskladněna v -80°C. Následně bylo k hipokampální tkáni přidáno PBS - *phosphate buffered saline*, pH 7.4 (#79382, SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA) a inhibitor proteáz (#P8340, SigmaAldrich, USA), tkáň byla zhomogenizována sonikátorem (amplituda 50; cyklus 0,5; chlazení na ledu) a zcentrifugována (2-16 PK, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Germany) při 1 000 g po dobu 10 minut a 4°C. Ze vzorků byl odebrán supernatant, ze kterého se Lowriho metodou (Lowry et al., 1951) s Petersonovou modifikací stanovilo množství proteinů (Peterson, 1977). Koncentrace celkového množství proteinů se mezi vzorky lišila. Tabulka č. 5 ukazuje průměrné hodnoty koncentrací proteinů (μg/μl), které byly pro normalizaci vzorků individuálně upraveny a vypočítány a následně nanášeny na gely. Lyzát byl poté smíchán s Laemmliho pufrům (#161-0737, *loading buffer*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a vzorky se 20 minut zahřívaly na 70°C.

Kmeny a skupiny potkanů		Koncentrace proteinů ve vzorku (μg/μl)	
		Průměr	S.E.M.
Wistar	PND 30 - Kontroly	7,56	0,31
	PND 30 - MK-801	7,57	0,35
	PND 60 - Kontroly	8,02	0,13
	PND 60 - MK-801	9,18	0,25
Long-Evans	PND 30 - Kontroly	7,48	0,30
	PND 30 - MK-801	6,90	0,36
	PND 60 - Kontroly	6,23	0,34
	PND 60 - MK-801	5,42	0,49

Tabulka č. 5. Koncentrace proteinů v hipokampálních vzorcích, stanovena Lowriho metodou s Petersonovou modifikací. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr (μg/μl) s S.E.M.

Pro separaci proteinů byly použity 4-15 % *Criterion Stain-Free* gradientní gely (#567-8084, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), na něž bylo od každého vzorku nanášeno množství 30 μg proteinů. Následná elektroforéza probíhala v Tris-Glycin-SDS pufru. Ihned po elektroforéze následovala vizualizace proteinů na gelu pomocí programu ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad), která umožnila jednak kontrolu vzorků a dále kvalitu jejich separace. Následně byly proteiny z gelu pomocí Trans-Blot Turbo přístroje (#170-4155, Bio-Rad) přeneseny na nitrocelulosovou membránu (#170-

4271, Bio-Rad) a opět proběhla vizualizace proteinů, tentokrát na membráně. Poté byly membrány zablokovány v 5% mléce (#170-6404, Bio-Rad) v TBS pufru s Tween (*Tris-buffered saline with Tween*: 0,05M Tris [pH 7.4], 0,1M NaCl, a 0,05% [v/v] Tween 20). Blokace probíhala v -5 °C, přes noc.

Další den bylo k membránám přidáno 1% mléko (Bio-Rad, USA) spolu s primárními monoklonálními protilátkami v koncentraci 1:1000 pro NR1 (NeuroMab clone N308/48) a NR2B podjednotku (NeuroMab clone N59/36) a 1:500 pro NR2A podjednotku (NeuroMab clone N327/95). Inkubace s protilátkami trvala 2 hodiny při pokojové teplotě. Poté byly membrány promyty 3x po 10 minutách promývacím pufrem a nechaly se hodinu inkubovat v pokojové teplotě se sekundární anti-mouse protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (#115-035-174, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, USA) v koncentraci 1:30 000. Nakonec proběhlo promytí promývacím pufrem, opět třikrát po 10 minutách.

Poté byl na membrány nanesen WestFemto SuperSignal chemiluminiscenční substrát (#34096, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a proběhla vizualizace na ChemiDoc™ Touch Imaging systému. Chemiluminiscenční a *stain-free* blot snímky byly analyzovány pomocí programu ImageLab 5.0. (Bio-Rad). *Stain-free* snímky, na kterých bylo vidět celkové množství proteinů, se použily pro normalizaci cílových proteinů.

6.6. Statistická analýza

6.6.1. Analýza behaviorálních parametrů

Ve vyvýšeném křížovém bludišti byly hodnoceny a měřeny základní parametry – čas potkanů strávený v otevřených, v uzavřených ramenech a na centrální plošině. V Morrisově vodním bludišti patřily k nejdůležitějším sledovaným hodnotám latence k nalezení skrytého ostrůvku, a dráha, kterou potkani uplavali před jeho nalezením. Mezi parametry zaznamenávané v úloze aktivního vyhýbání se místu patřil počet vstupů potkanů do zakázaného sektoru (počet chyb) a celková nachozená dráha potkanů na aréně, spočítaná jako úhrnná vzdálenost bodů snímanou každou sekundu. Dále byl sledován maximální čas mezi dvěma vstupy do zakázaného sektoru (maximální čas vyhýbání) a interval, po kterém došlo k prvnímu vstupu do zakázané oblasti. Jejich hodnoty však korelovaly s počtem chyb a vykazovaly větší rozptyly, proto nejsou zahrnuty v hodnocení. Hodnoty byly získány a vyhodnoceny následnou *offline* analýzou v programu Carousel Maze Manager 0.3.5 (Bahnik, 2013).

Pro všechna behaviorální data byla provedena statistická analýza odděleně pro každý kmen a každou kohortu. Data z EPM byla hodnocena pomocí nepárového dvouvýběrového t-testu (angl. *unpaired two-tailed t-test*), a porovnávala rozdíly mezi potkany, kteří dostávali MK-801 a mezi

kontrolnímu skupinami. Pro statistickou analýzu MWM a úlohy aktivního vyhýbání se místu byla použita dvoufaktorová analýza rozptylu s opakovanými měřeními (angl. *two-way repeated-measures ANOVA*), se skupinami (MK-801/kontroly) jako hlavním faktorem a sezeními jako opakovanými měřeními. Pokud to bylo vhodné, ANOVA byla následována Sidakovým post-hoc testem. Všechny výpočty byly provedeny s využitím GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., USA). Rozdíly byly považovány za signifikantní, pokud byla hodnota pravděpodobnosti p menší než 0,05. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm střední chyba průměru (S.E.M.).

Kmeny potkanů nebyly vzájemně porovnávány z toho důvodu, že oba kmeny byly testovány v odlišných časových obdobích a odděleně, čímž by se do výsledků promítly efekty oddělených testování (angl. *batch-effects*) a taková analýza by nebyla korektní. Neporovnávaly se vzájemně ani jednotlivé věkové kohorty (PND 30 vs. PND 60), protože behaviorální testy u nich byly z důvodů načasování provedeny v odlišném věku. Vždy se porovnávaly pouze skupiny v rámci kmene a jedné věkové kohorty.

6.6.2. Analýza biochemických parametrů

Snímky cílových proteinů a *stain-free* blot snímky s obsahem celkového množství proteinů byly vytvořeny v systému ChemiDocTM Touch a analyzovány v programu ImageLab 5.2.1. (obojí Bio-Rad). Naměřené hodnoty byly testovány na odlehle hodnoty spočítáním *z-score* a následně byly vyloučeny hodnoty, které měly *z-score* větší než 2. Bylo použito 14-16 vzorků z každé skupiny. Pro statistickou analýzu byla v tomto případě použita Statistica 9 (StatSoft, 2009) a grafy byly opět vytvořeny za použití GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., USA). V bioanalytické části studie již byly porovnávány hladiny exprese podjednotek NMDA receptorů nejen mezi skupinami, ale také mezi věkovými kohortami. Kmeny z důvodu odděleného testování porovnávány nebyly. Pro testování statisticky signifikantních rozdílů (prahová hodnota $p < 0,05$) byl použit studentův *t*-test. Data jsou vyobrazena jako průměr \pm střední chyba průměru (S.E.M.) kontrolních skupin v procentech.

7. Výsledky

7.1. Obecná pozorování ve vztahu k aplikaci MK-801

7.1.1. Akutní účinky

U potkanů, kterým bylo aplikováno 0,5 mg/kg látky MK-801 po dobu dvou týdnů, byly pozorovány akutní behaviorální změny. To se předpokládalo vzhledem k tomu, že je dávka 0,5 mg/kg téměř o řád vyšší než dávky v akutních studiích, které byly v laboratoři použity (Stuchlik et al., 2004; Vales et al., 2006; Lobellova et al., 2013) a přitom vyvolávaly akutní změny.

První akutní účinky látky byly pozorovány v průměru za 6-8 minut po aplikaci jako potíže potkanů s pohybem a rovnováhou. Většina zvířat vykazovala hyperaktivitu, ale nezvládala se samostatně postavit bez podpory stěn a plazila se, projevílo se také čichání a slinění a objevila se i ataxie. Závažnost a typ účinků se lišila v rámci jedinců i v rámci dní. Některá zvířata reagovala bouřlivěji například na první injekci, než na poslední, a u některých byly motorické problémy závažnější. Někteří potkani vykazovali hyperaktivitu, skákali a škrábali po stěnách boxu, v kterém byli umístěni, zatímco jiní se zdáli být spíše paralyzováni, neaktivní, nehýbali se a ignorovali přítomnost dalších zvířat a environmentálních stimulů. Tyto stavy přetrvávaly někdy ještě 90 min po injekci. Na rozdíl od toho vykazovaly kontrolní skupiny obvyklé a stabilizované chování.

7.1.2. Dlouhodobé kvalitativní účinky

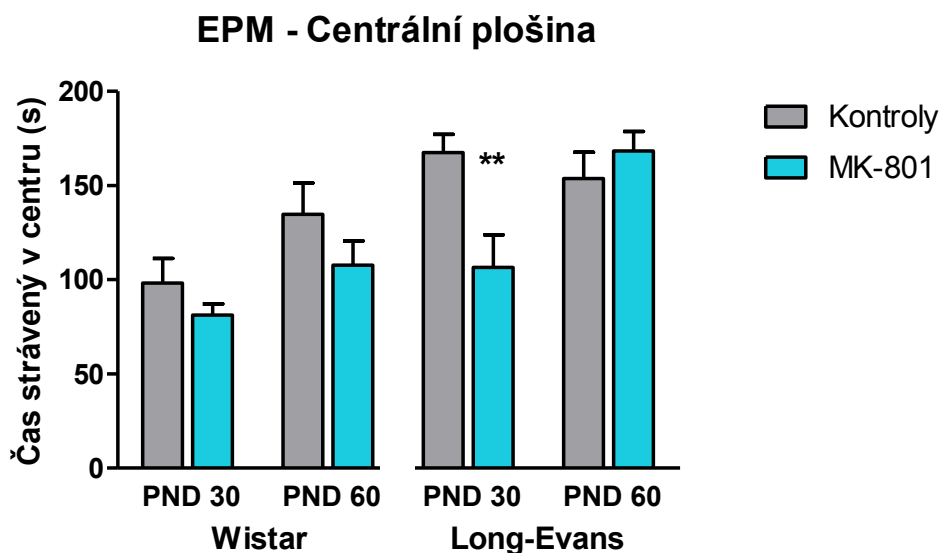
Po odeznění akutních účinků bylo u čtyř potkanů kmene Long-Evans (jeden z kohorty PND 30, tři z kohorty PND 60) pozorováno propuknutí úzkostného, panického a agresivního chování. Jeden potkan kmene Long-Evans, kterému bylo aplikováno MK-801 od PND 30, vykazoval od testování v EPM (v PND 49) a následně během všech behaviorálních testů toto chování ve větší míře, nicméně všechny testy nakonec dokončil. Podobná situace nastala u dalších tří potkanů Long-Evans, kterým bylo aplikováno MK-801 od PND 60, a to během testování v MWM. Bylo u nich pozorováno natolik úzkostné chování, že se nenechali vůbec vyjmout z chovné klece a umístit do bludiště – trvale vykazovali agresivní projevy a vyskakovali z ostrůvku v Morrisově vodním bludišti. Někteří se dokonce ukrývali pod vodou, když měli být z bazénku vytaženi. Proto museli být z dalších behaviorálních testů vyřazeni (jeden potkan od PND 82, další dva od PND 85). Všechna tato čtyři výše zmíněná zvířata musela být následkem svého chování umístěna v boxech samostatně a bylo vysoce obtížné až nemožné s nimi manipulovat. Tato zvířata byla také použita k bioanalytickému stanovení, jehož parametry však neukázaly odchylky od ostatních zvířat. U kmene Wistar se tyto dlouhodobé kvalitativní změny chování nevyskytovaly.

7.2. Behaviorální data

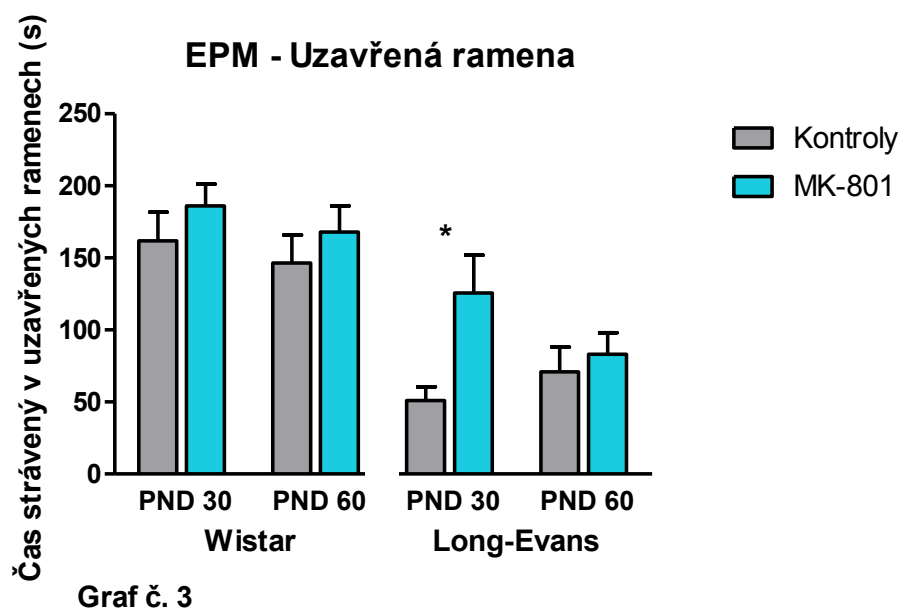
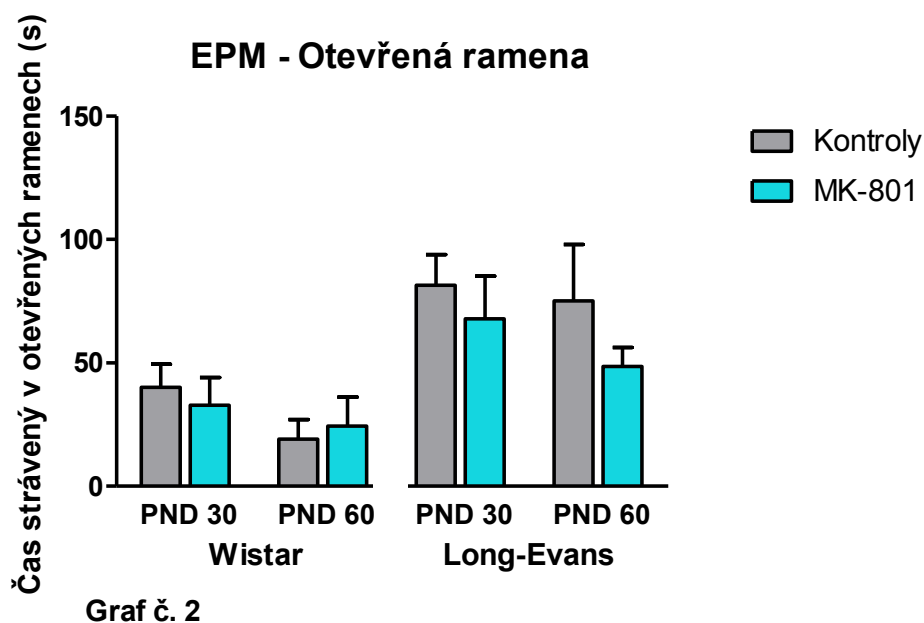
7.2.1. Vyvýšené křížové bludiště

Data získaná z EPM naznačují, že subchronická aplikace MK-801 má na anxiету u kmene potkanů **Wistar** pouze nevýznamný vliv (jak ukazují grafy č. 1, 2, 3). Nepárový dvouvýběrový t-test nezjistil významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou, které bylo aplikováno MK-801 u kohorty **PND 30** v době strávené v centru ($t(14) = 1,195$; $P > 0,05$), v otevřených ramenech ($t(14) = 0,493$; $P > 0,05$), a uzavřených ramenech ($t(14) = 0,965$; $P > 0,05$). Podobná situace byla pro tento kmen zjištěna i u kohorty **PND 60**: čas strávený v centru ($t(14) = 1,279$; $P > 0,05$), v otevřených ramenech ($t(14) = 0,369$; $P > 0,05$) a v uzavřených ramenech ($t(14) = 0,816$; $P > 0,05$).

U potkanů kmene **Long-Evans** se již ukázalo několik významných rozdílů (viz grafy č. 1 a č. 3). Ve srovnání s kontrolami strávili potkani, jimž bylo aplikováno MK-801 od **PND 30**, výrazně méně času na centrální platformě ($t(14) = 3,087$; $P = 0,0064$), zatímco čas strávený v uzavřených ramenech měli signifikantně delší ($t(14) = 2,686$; $P = 0,0151$). Na druhou stranu, čas strávený v otevřených ramenech se mezi skupinami nelišil ($t(14) = 0,6365$; $P > 0,05$). U kohorty **PND 60** ale nepárový dvouvýběrový t-test nepotvrdil žádný signifikantní rozdíl mezi skupinami: čas strávený v centru ($t(14) = 0,841$; $P > 0,05$), v otevřených ramenech ($t(14) = 1,102$; $P > 0,05$) v uzavřených ramenech ($t(14) = 0,529$; $P > 0,05$).



Graf č. 1

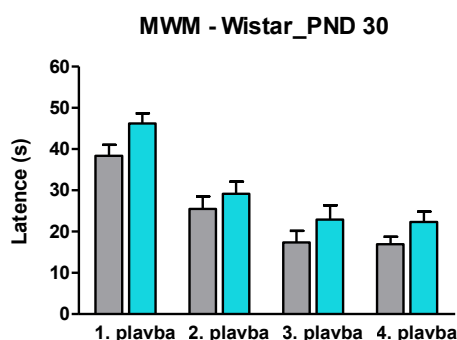


Grafy č. 1, 2, 3. Výkonnost obou kmenů potkanů i obou kohort v EPM jsou zde zobrazeny jako celková doba, kterou potkani strávili v centrální části (graf č. 1), v otevřených ramenech (graf č. 2) a v uzavřených ramenech (graf č. 3). Porovnání MK-801 a kontrolní skupiny potkanů u každé kohorty ukázalo signifikantní rozdíl pouze v případě potkanů Long-Evans u kohorty PND 30 a to v čase stráveném v centru bludiště a v uzavřených ramenech. Data jsou reprezentována jako průměr ± střední chyba průměru (S.E.M.). Počet hvězdiček udává hladinu statistické významnosti: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

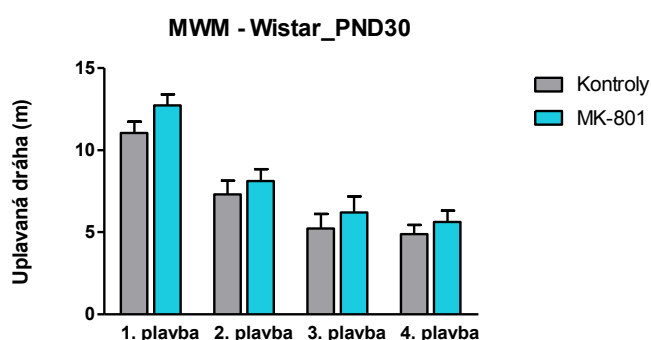
7.2.2. Morrisovo vodní bludiště

Pro kvantifikaci výkonů v DMP verzi MWM byla zprůměrována latence k nalezení skrytého ostrůvku a celková dráha k jeho dosažení v průběhu deseti dní testování. Jak je patrné z grafů č. 4-11, všechny skupiny, jakmile se již jednou naučily pozici ostrůvku při první plavbě, měli při následujících plavbách latenci i uplavanou dráhu nižší (signifikantní efekt plavby: $p < 0,0001$ ve všech případech).

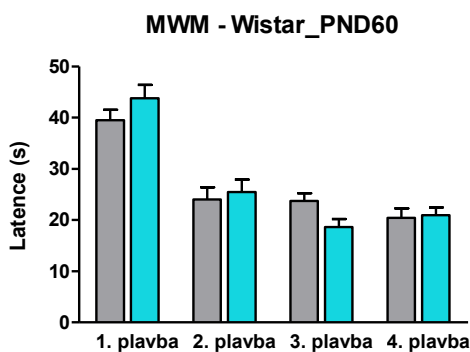
Z výsledků dvoufaktorové analýzy rozptylu s opakovanými měřeními vyplývá, že jednotlivé skupiny kontrolních potkanů kmene **Wistar** - jak kohorta **PND 30** (latence: $F(1, 14) = 4,556$; $P = 0,0510$; uplavaná dráha: $F(1, 14) = 1,876$; $P = 0,1923$), tak **PND 60** (latence: $F(1, 16) = 0,02082$; $P = 0,8871$; uplavaná dráha: $F(1, 14) = 0,9012$; $P = 0,3586$) a **Long-Evans** v kohortě **PND 30** (latence: $F(1, 18) = 0,1822$; uplavaná dráha: $F(1, 18) = 0,3335$) nevykazovaly v MWM významný rozdíl ani v jednom sledovaném parametru v porovnání se skupinami, kterým bylo aplikováno MK-801 (grafy č. 4–9). V kontrastu s tímto zjištěním bylo u kmene **Long-Evans** v kohortě **PND 60** u potkanů ovlivněných aplikací MK-801 oproti kontrolám pozorováno signifikantní prodloužení latence ($F(1, 15) = 11,55$; $P = 0,004$; graf. č. 10 a uplavané dráhy před nalezením skrytého ostrůvku ($F(1, 15) = 8,78$; $P = 0,0097$) během experimentu (graf č. 11).



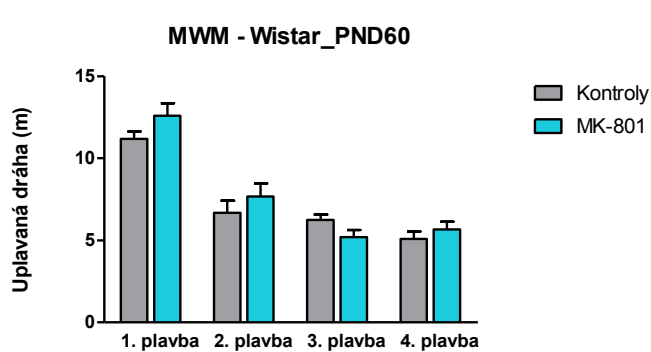
Graf č. 4



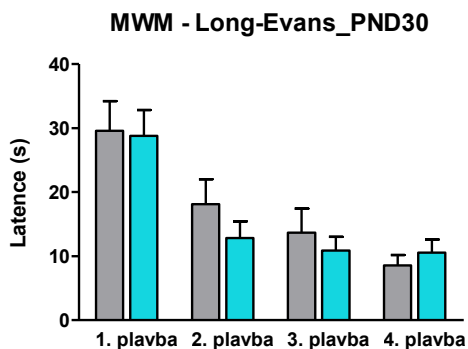
Graf č. 5



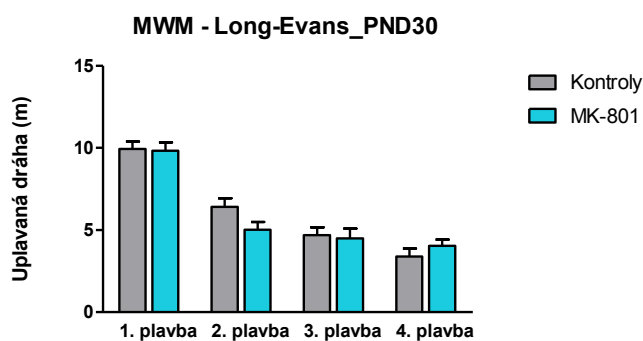
Graf č. 6



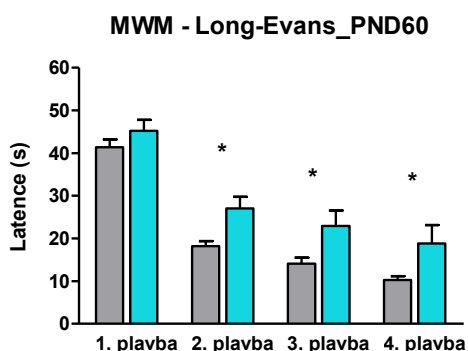
Graf č. 7



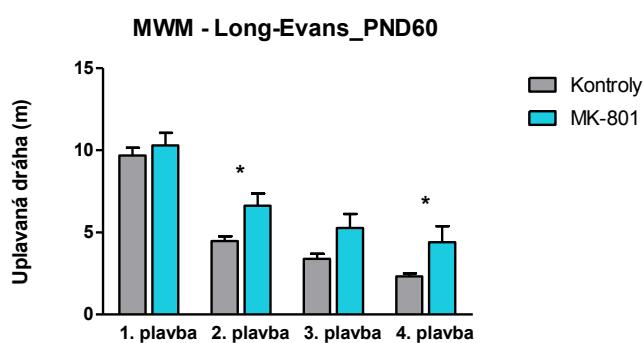
Graf č. 8



Graf č. 9



Graf č. 10



Graf č. 11

Grafy č. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11. Výkonnost potkanů v MWM. Latence a dráha k nalezení skrytého ostrůvku pro každou ze čtyř plaveb zprůměrovanou během deseti dní testování. U potkanů kmene Long-Evans v kohortě PND 60 lze v důsledku MK-801 pozorovat signifikantně vyšší jak latenci, tak uplavanou dráhu (* $p < 0,05$). Data jsou zobrazena jako průměr \pm střední chyba průměru (S.E.M.).

7.2.3. Aktivní vyhýbání se místu s přeučením na rotující aréně

Grafy č. 12-19 graficky znázorňují hodnocený parametr pro všechny skupiny a kohorty v obou kmenech, jímž byl počet vstupů do zakázaného sektoru jak během fáze osvojení si úlohy, tak přeučení na novou polohu zakázaného sektoru. Tento parametr odráží schopnost přesné lokalizace zakázaného sektoru na rotující aréně.

Potkani kmene **Wistar** u kohorty **PND 30**, a to jak experimentální, tak kontrolní zvířata, neprokázali v první fázi schopnost naučit se lokalizovat zakázaný sektor, i když u nich byly tendence ke zlepšování, které ale nedosáhly statistické významnosti (efekt sezení $F(4, 56) = 2,523$; $P = 0,051$; efekt skupin: $F(1, 14) = 0,008863$; $P = 0,9263$; interakce: $F(4, 56) = 1,732$; $P = 0,1557$; graf č. 12). Podobná situace byla pozorována i po přemístění zakázaného sektoru do protilehlého kvadrantu (fáze přeučení). Byl patrný pouze trend ke zlepšování (nesignifikantní efekt dne $F(4, 56) = 2,062$; $P =$

0,0981). Nicméně vzájemné výkony skupin mezi sebou v průběhu testování kolísaly, což se odrazilo v signifikantním rozdílu druhý den. To prokázal Sidakův post-hoc test, který byl proveden u dat po signifikantním efektu interakcí $F(4, 56) > 3,337$; $P = 0,0161$ (graf č. 13). Vzhledem k tomu, že se skupiny neučily, předpokládáme, že tento rozdíl ve druhé fázi sezení představoval náhodnou fluktuaci. Zdá se tedy, že potkani kmene Long Evans si v tomto relativně mladém věku nedovedou osvojit řešení úlohy aktivního vyhýbání se místu.

Potkani kmene **Wistar**, kterým bylo aplikováno MK-801 nebo fyziologický roztok od **PND 60** řešili počáteční fázi (=osvojení) na aréně úspěšněji (graf č. 14). Dvoufaktorová ANOVA s opakovanými měřeními ukázala signifikantní efekt sezení ($F(4, 56) = 19,92$; $P < 0,0001$), ale ne skupin ($F(1, 14) = 0,5101$; $P = 0,4868$). Sidakův post-hoc test, který byl následně proveden pro data po signifikantním efektu interakcí ($F(4, 56) = 3,088$; $P = 0,0228$) tentokrát žádné rozdíly mezi skupinami v žádném ze sezení nepotvrdil. Fáze přeučení byla u tohoto kmene doprovázena sníženým počtem vstupů do zakázaného sektoru jak u kontrolní skupiny, tak u skupiny, která byla vystavena působení MK-801 (efekt sezení: $F(4, 56) = 4,127$; $P = 0,0053$). Z grafu č. 15 by se mohlo zdát, že potkani, kterým bylo aplikováno MK-801 ve věku PND 60 měli na aréně lepší výkonnost, nicméně ANOVA s opakovanými měřeními tento parametr jako signifikantní nepotvrdila (efekt skupin: $F(1, 14) = 4,245$; $P = 0,0585$; efekt interakcí: $F(4, 56) = 2,023$; $P = 0,1036$).

Analýza dat u potkanů kmene **Long-Evans** ukázala ve fázi osvojení u kohorty **PND 30** signifikantní efekt sezení ($F(4, 72) = 7,725$; $P < 0,0001$), ale ne skupin ($F(1, 18) = 0,06638$; $P = 0,7996$), ani interakcí ($F(4, 72) = 0,5887$; $P = 0,6718$; graf č. 16). První den fáze přeučení byl pozorován relativně vysoký počet vstupů do zakázaného sektoru, ten však během doby testování signifikantně klesl ($F(4, 72) = 7,232$; $P < 0,0001$), rovnoměrně v obou skupinách (efekt skupin: $F(1, 18) = 1,699$; $P = 0,2088$; efekt interakcí: $F(4, 72) = 0,967$; $P = 0,431$; graf č. 17).

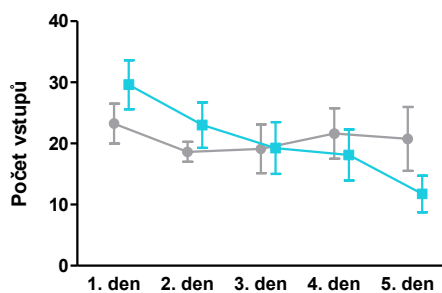
Stejný trend výsledků byl pozorován i u kmene **Long-Evans** u kontrolní skupiny a skupiny, které bylo aplikováno MK-801 od věku **PND 60**. Všechna tato zvířata se během fáze osvojení byla schopna naučit pozici zakázaného sektoru (efekt sezení: $F(4, 60) = 14,26$; $P < 0,0001$; efekt skupin: $F(1, 15) = 0,6636$; $P = 0,4280$; efekt interakcí: $F(4, 60) = 1,131$; $P = 0,3504$; graf č. 18). Ovšem ani jedné ze skupin se nepodařilo zlepšit výkony poté, co byl zakázaný sektor přemístěn do protilehlé lokace na aréně (fáze přeučení), i když byl pozorován trend ke snížení počtu vstupů do zakázaného sektoru v průběhu dní (efekt sezení: $F(4, 60) = 1,789$; $P = 0,1428$; efekt skupin: $F(1, 15) = 0,3453$; $P = 0,5655$; efekt interakcí: $F(4, 60) = 2,01$; $P = 0,1045$; graf č. 19).

Kromě počtu vstupů do zakázaného sektoru byla také hodnocena celková vzdálenost, kterou potkani na aréně nachodili, a to s cílem zjištění dlouhodobého vlivu subchronické aplikace MK-801 na

lokomoční aktivitu, ale dvoufaktorová ANOVA neukázala signifikantní efekt skupin ani interakcí v žádné z kohort. Z tohoto důvodu nejsou výsledky prezentovány.

Fáze osvojení

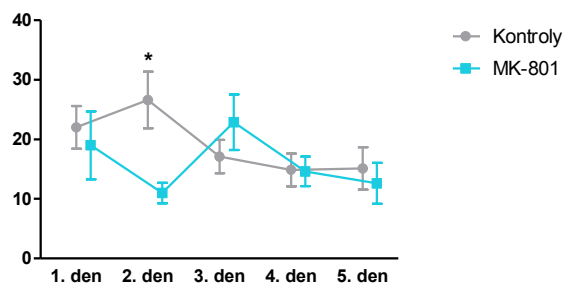
Aréna - Wistar_PND30



Graf č.12

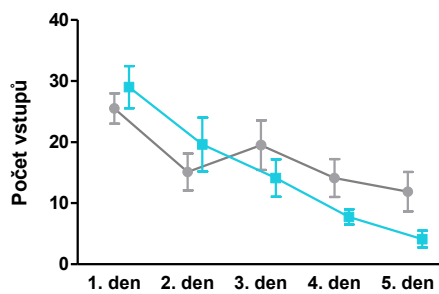
Fáze přeučení

Aréna - Wistar_PND30



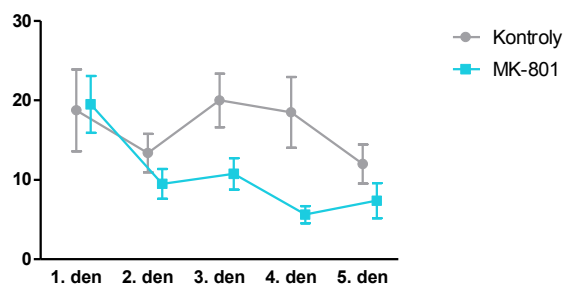
Graf č.13

Aréna - Wistar_PDN60



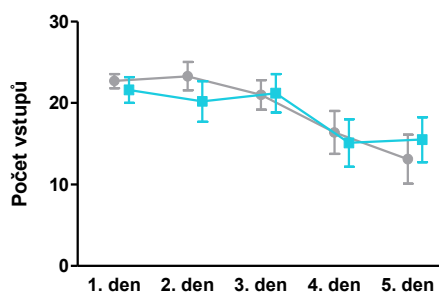
Graf č.14

Aréna - Wistar-PND60



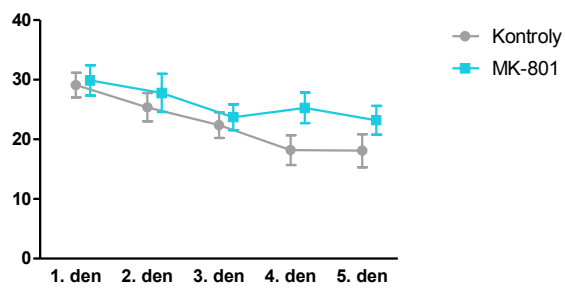
Graf č.15

Aréna - Long-Evans_PND30

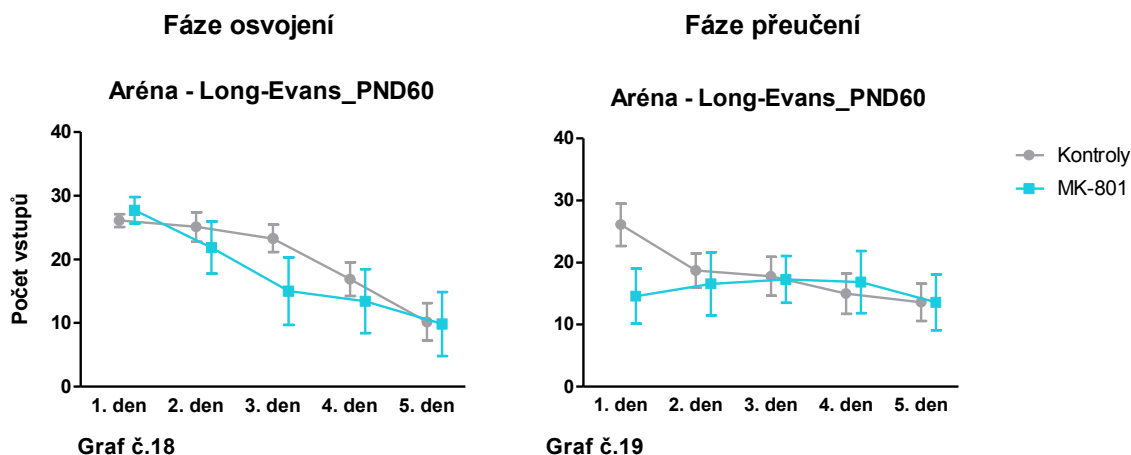


Graf č.16

Aréna - Long-Evans_PND30



Graf č.17



Grafy č. 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19. Výkonnost potkanů v úloze aktivního vyhýbání se místu na aréně. Zobrazeno a hodnoceno jako celkový počet vstupů do zakázaného sektoru během fáze osvojení (levý sloupec grafů) a během fáze přeučení (pravý sloupec grafů). Rozdíly mezi MK-801 a kontrolní skupinou potkanů dosáhly statistické významnosti pouze během 2. dne fáze přeučení u potkanů kmene Wistar v kohortě PND 30 (* $p < 0.05$). Data jsou vyobrazena jako průměr \pm střední chyba průměru (S.E.M.).

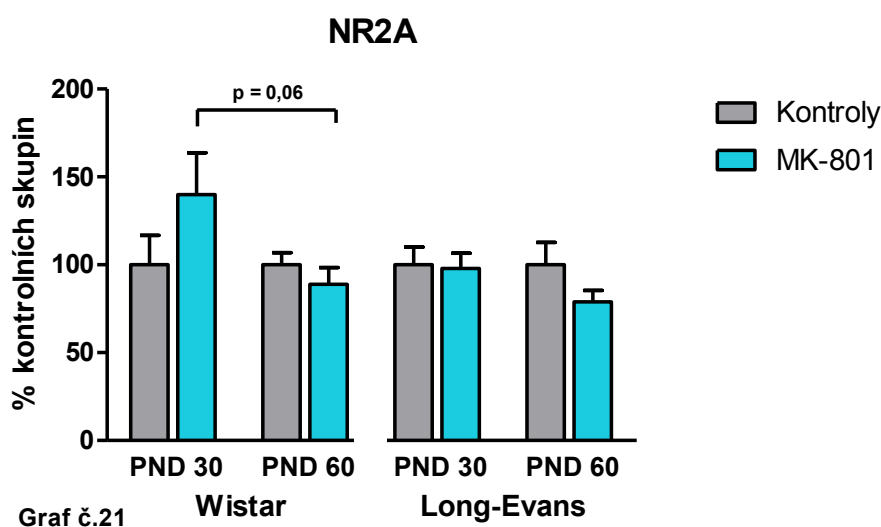
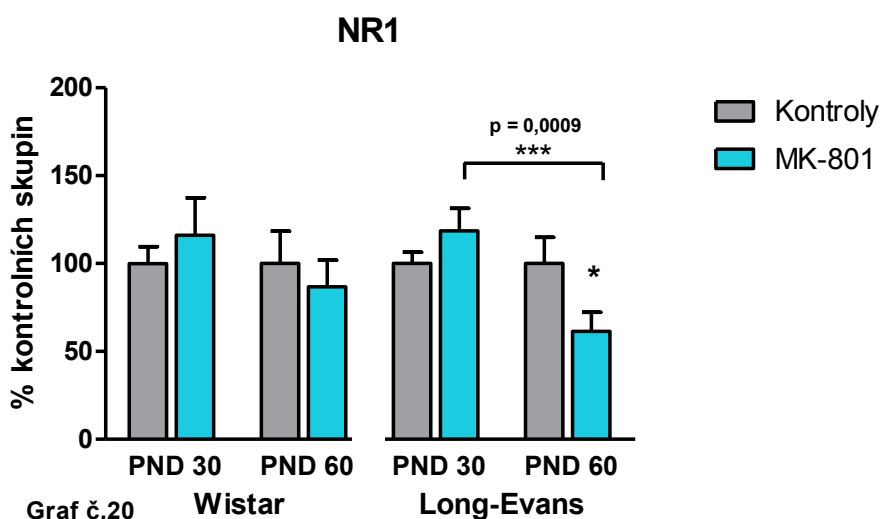
7.3. Analýza změn v hladinách exprese podjednotek NMDA receptorů

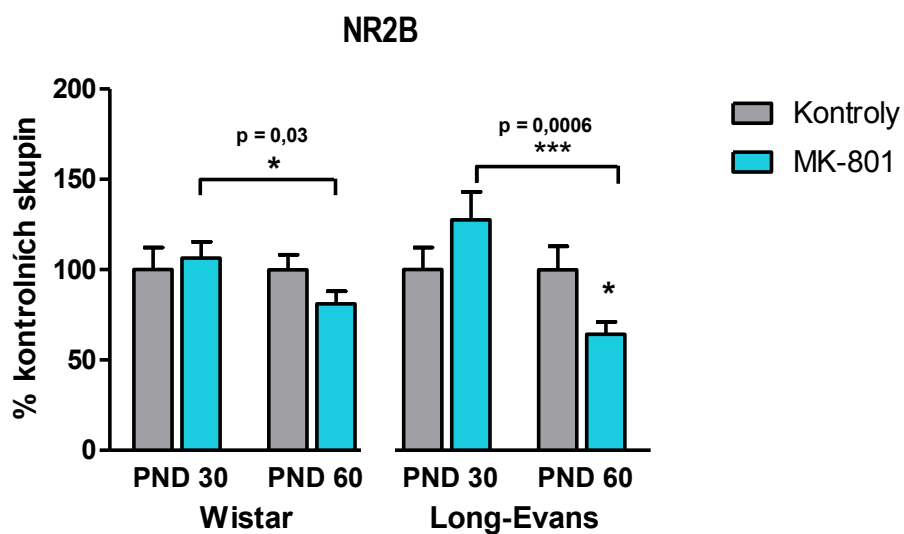
Kromě behaviorálních změn po subchronické aplikaci MK-801 byly také sledovány změny v expresi podjednotek NMDA receptorů v hipokampu potkanů, a to konkrétně NR1, NR2A a NR2B podjednotek. Mezi kontrolními skupinami u obou kmenů potkanů a obou kohort nebyl zjištěn žádný významný rozdíl v expresi ani jedné ze tří pozorovaných podjednotek NMDA receptorů.

U potkanů kmene **Long-Evans**, kterým bylo aplikováno MK-801 od **PND 60** byla zjištěna signifikantně nižší hipokampální exprese podjednotky **NR1** oproti kontrolám, a to o 38,9 % ($p = 0,043$). U tohoto kmene potkanů byl také pozorován rozdílný efekt MK-801 na věkové skupiny (kohorty). Long-Evans potkani, kteří byli vystaveni působení MK-801 od **PND 30** vykazovali nesignifikanční trend ke zvýšení exprese podjednotky NR1 o 21% ve srovnání s kontrolami, ale v porovnání s potkany, kterým bylo MK-801 aplikováno až od PND 60 bylo toto zjištění signifikantní ($p = 0,0009$). Signifikanční rozdíly v expresi podjednotky NR1 u potkanů kmene **Wistar** nebyly nalezeny (graf č. 20).

Porovnání změn v expresi podjednotky **NR2A** nepřineslo žádné významné rozdíly mezi potkany ovlivněnými aplikací MK-801 a kontrolními skupinami ani u jednoho z kmenů. Pouze srovnání výsledků mezi potkany kmene **Wistar**, kterým bylo aplikováno MK-801 v odlišnou dobu jejich vývoje (ve věku PND 30 a PND 60) ukázalo trend změny ($p = 0,06$; graf č. 21).

Ovšem v expresi podjednotky **NR2B** v hipokampu potkanů bylo po subchronické aplikaci MK-801 zjištěno několik změn. Celkové změny v její expresi se u potkanů obou kmenů lišily dle věku, od kterého byla zvířata poprvé vystavena působení MK-801. Pokud bylo MK-801 aplikováno potkanům od **PND 30**, byla pozorována nesignifikantně zvýšená exprese NR2B podjednotky, ale u potkanů, kterým bylo MK-801 podáváno od **PND 60** byla zjištěna její snížená exprese. U kmene **Long-Evans** v kohortě PND 60 bylo toto snížení signifikantní o 35,8 % v porovnání s kontrolními zvířaty ($p = 0,02$). Také srovnání efektů MK-801 na expresi NR2B podjednotky po aplikaci MK-801 objevilo signifikantní rozdíly mezi věkovými kohortami PND 30 a PND 60, a to jak u potkanů kmene Wistar ($p = 0,03$), tak u kmene Long-Evans ($p = 0,0006$; graf č. 22), což prokázalo odlišnost změn, navozených MK-801 v různých věkových obdobích. Jiné změny v expresi NR1, NR2A a NR2B podjednotek NMDA receptorů nebyly po subchronické administraci MK-801 pozorovány.





Grafy č. 20., 21., 22. Expres podjednotek NMDA receptorů v hipokampu potkanů po aplikaci MK-801. Jsou zde vidět dva věkové intervaly, ve kterých se MK-801 potkanům začalo aplikovat (PND 30, PND 60). Data použitá v grafu vyjadřují průměrnou hodnotu chemiluminiscence značeného proteinu po normalizaci na celkový obsah proteinu ve vzorku, kontrolní skupiny jsou zde vyjádřeny jako 100%.

8. Diskuze

Tato práce se zabývala účinky subchronického podávání MK-801 potkanům kmene Wistar a Long-Evans v adolescentním období (PND 30) a v období časně dospělosti (PND 60). Prvním cílem práce bylo zjistit, jaké dlouhodobé změny navozuje MK-801 v neurobehaviorálních funkcích. Druhým cílem bylo zjištění změn v expresi podjednotek NMDA receptorů (NR1, NR2A, NR2B) v hipokampu potkanů. A posledním cílem bylo zhodnocení, zdali tato manipulace představuje spolehlivý a prakticky použitelný animální model schizofrenii-podobného chování u obou kmenů potkanů.

V předchozích studiích již bylo prokázáno, že akutní aplikace MK-801 může napodobit některé příznaky schizofrenie a psychózy, ale nevede k navození dlouhodobého kognitivního deficitu a takovéto použití je proto omezené. Experimenty se nadále zaměřují na subchronické podávání MK-801 (a také PCP a ketaminu – dalších non-kompetitivních antagonistů NMDA receptorů) hlodavcům s cílem dosáhnout u nich dlouhodobých změn v chování a neurotransmisi. Subchronická aplikace MK-801 má u potkanů za následek nižší extracelulární hladiny glutamátu v čelním laloku (Zuo et al., 2006). V jiné studii bylo zjištěno, že po dvoutýdenní subchronické aplikaci MK-801 potkani výrazně zhoršili svojí výkonnost v MWM a současně se od kontrolních zvířat nelišili v hmotnosti nebo v pohybové aktivitě (Li et al., 2011). To, že by animální modely schizofrenie, využívající subchronickou aplikaci antagonistů NMDA receptorů v raném adolescentním období, mohly mít dobrou prediktivní validitu, podporuje také zmírňující účinek atypických antipsychotik na potkany, u kterých aplikace MK-801 navodila kognitivní zhoršení bez vedlejších účinků jako je hyperlokomoce. Dříve publikované studie ovšem ukazují kontroverzní účinky a výsledky subchronické aplikace MK-801 potkanům v postnatálním a raném adolescentním období na kognici v prostorových a neprostorových úlohách, což se v mnoha oblastech podobá zjištěním v této práci.

Z výsledků získaných ve vyvýšeném křížovém bludišti v této práci je vidět, že dvoutýdenní subchronická aplikace MK-801 v dávce 0,5 mg/kg neměla na anxieta u kmene potkanů Wistar výrazný vliv. Potkani z tohoto kmene, kterým bylo aplikováno MK-801 (bez ohledu na věk), trávili sice více času v uzavřených ramenech, ale výsledky nebyly signifikantní. K rozdílnému výsledku došel Baier a jeho tým, kteří doložili u potkanů kmene Wistar zvýšenou anxieta v PND 90 po předchozí aplikaci 0,25 mg/kg MK-801 v PND 6 – 21 (Baier et al., 2009). Proč nebyly pozorovány žádné změny v anxietě u potkanů kmene Wistar, nelze se stávajícími údaji uspokojivě vysvětlit. Naopak u Long-Evans potkanů se úzkostné chování prokázalo, a to u skupiny, které bylo aplikováno MK-801 od adolescentního období, jelikož tato zvířata trávila signifikantně méně času na centrální plošině a více v uzavřených ramenech. Ve výsledcích zahrnujících dobu strávenou v otevřených ramenech se žádné skupiny významně nelišily, což je v souladu se studií Liu a kolegů, kteří také po aplikaci MK-801 (dávky 0,1; 0,3 a 0,5 mg/kg MK-801, během PND 7 – PND 21) nepozorovali

výrazné změny v době, kterou potkani v těchto ramenech trávili (Liu et al., 2017). V kontrastu s výsledky této práce u kmene Long-Evans je nález Kocahana a jeho týmu, kteří pozorovali v EPM menší anxieta po aplikaci 0,25 mg/kg MK-801 v PND 7- 10 (Kocahan et al., 2013). Ke stejnému závěru došli i Latysheva a Rayevsky, a to po aplikaci 0,05 mg/kg MK-801 v PND 7 – 49 (Latysheva a Rayevsky, 2003).

Je zajímavé, že testování prostorové navigace v DMP verzi MWM odhalilo poškození pracovní paměti 19 dní po aplikaci MK-801 pouze u skupiny potkanů Long-Evans, kterým byla tato látka aplikována v období časně dospělosti. U ostatních potkanů nebylo pozorováno žádné zhoršení výkonů, což odpovídá závěrům McLamba a jeho týmu, kteří po aplikaci 0,02 mg/kg MK-801 v PND 9-15 také u potkanů nezaznamenali žádné zhoršení v MWM (McLamb et al., 1990). Všichni potkani ovlivnění aplikací MK-801 se v tomto úkolu zlepšovali pomaleji než kontrolní zvířata, nicméně se i tak byli schopni naučit úlohu řešit. Podobnou situaci pozorovali ve své studii i Gorter a de Bruin, kdy po aplikaci 0,25 mg/kg MK-801 v PND 8-19 u těchto potkanů v dospělosti zjistili pomalejší učení (Gorter a de Bruin, 1992). I u myši bylo prokázáno, že aplikace 0,1 mg/kg MK-801 v PND 3 – 17 zhoršuje jejich výkony v této úloze (Elhardt et al., 2010).

Třicet dní od aplikace MK-801 se u potkanů neprojeví efekty na kognitivní koordinaci a flexibilitu, testovanou v úloze aktivního vyhýbání se místu. Rozdíly ve výkonech mezi kontrolními a experimentálními potkany nebyly pozorovány. To je v souladu se studií Kocahana a jeho kolegů, jimž se nepodařilo nalézt behaviorální deficit u potkanů kmene Wistar v úloze pasivního vyhýbání se (test probíhal v PND 35-45), kterým bylo MK-801 aplikováno v PND 7- 10 (Kocahan et al., 2013). Signifikantní rozdíl byl zjištěn pouze mezi výkony MK-801 ovlivněných a kontrolních potkanů druhý den fáze přeučení u kmene Wistar v kohortě PND 30. Vzhledem k tomu, že se však skupiny neučily, se předpokládá, že tento rozdíl ve druhém sezení představoval náhodnou fluktuaci. Obecně potkani, kterým bylo aplikováno MK-801 od období adolescence nevykazovali efektivní učení ani v jedné z fází úkolu. To je v souladu s našimi zatím nepublikovanými výsledky, že mladší věkové kategorie potkanů nejsou v tomto úkolu zdatní.

Za symptom korelující s pozitivními příznaky schizofrenie a jedním z nejvíce charakteristických účinků navozených subchronickou aplikací MK-801 je považována hyperlokomoce (Lim et al., 2012). Po subchronické aplikaci MK-801 nebyla ani v DMP verzi MWM ani v úloze aktivního vyhýbání se místu pozorována hyperlokomoce, jaká byla zjištěna po akutní aplikaci MK-801 v téže dávce (Hargreaves a Cain, 1995). Ke stejnému závěru došel i McLamb s kolegy, kteří po aplikaci 0,02 mg/kg MK-801 u potkanů Fischer-344 v PND 9-15 nezaznamenali žádné jeho účinky na lokomoční aktivitu testovanou v MWM (McLamb et al., 1990). V jiné studii bylo naopak pozorováno u potkanů kmene Wistar zvýšení spontánní lokomoce v testu otevřeného pole po aplikaci 0,25 mg/kg

MK-801 v PND 7- 10 (Kocahan et al., 2013). Stejný výsledek přinesla i další studie, ve které byla u potkanů kmene Wistar po aplikaci zvyšující se dávky MK-801 (0,5 až 1 mg/kg) od PND 1 – 22 pozorována zvýšená aktivita, která přetrvávala až do PND 60 (Facchinetti et al., 1993). Je možné, že případné dlouhodobé účinky subchronické aplikace MK-801 na lokomoci byly v této práci zakryty tím, že byla testována tzv. "vynucená lokomoce" v úloze aktivního vyhýbání se místu, kde se potkani museli pohybovat, aby se vyhnuli potrestání v podobě elektrického šoku, namísto testování spontánní aktivity v testu otevřeného pole. Tento test tak může být na lokomoční změny méně citlivý.

Expresí NMDA podjednotek v hipokampu potkanů odráží jejich zhoršené výkony v behaviorálních testech. U potkanů kmene Wistar nebyly pozorovány žádné změny v expresi NR1, NR2A a NR2B podjednotek NMDA receptorů. Pouze se u nich projevil rozdílný efekt časového období aplikace MK-801. Potkani kmene Wistar, kterým bylo aplikováno MK-801 od adolescentního období vykazovali mírné zvýšení exprese podjednotky NR2A a signifikantní zvýšení podjednotky NR2B ve srovnání se skupinou, které bylo aplikováno MK-801 v období časně dospělosti. Stejně tak byla zjištěna signifikantně zvýšená exprese NR1 a NR2B podjednotek u potkanů kmene Long-Evans, kterým bylo aplikováno MK-801 v období adolescence v porovnání s potkany, kteří byli ovlivněni MK-801 až od období časně dospělosti. Tyto změny, viditelné u obou kmenů, se v behaviorálních testech neprojevily, ale mohly být způsobeny právě aplikací MK-801, jelikož by chronická blokáda NMDA receptorů mohla vést k jejich syntéze de novo (Elhardt et al., 2010).

Dále byla zjištěna signifikantně nižší exprese podjednotek NR1 (o 38,9 %) a NR2B (o 35,8 %) u potkanů kmene Long-Evans, kterým bylo aplikováno MK-801 v období časně dospělosti ve srovnání s kontrolními skupinami. Tyto výsledky mohou naznačovat přímou vazbu mezi počtem NR1 receptorů a změnami v chování. Podobná zjištění, kdy potkani exprimující pouze 5% podjednotky NR1 vykazovali abnormality v chování podobné těm, které jsou pozorovány u animálního modelu schizofrenie, uvedl i Mohn s kolegy (Mohn et al., 1999). Wang a jeho tým dále naznačili, že behaviorální plasticita spojená s chronickým podáváním PCP, může souviset se změnami stechiometrie NMDA podjednotek v předním mozku (Wang et al., 1999). Oh s kolegy zjistili zvýšený počet podjednotky NR1 v oblasti CA1 hipokampu po intra-cerebro-ventrikulární infuzi MK-801 u potkanů kmene Sprague-Dawley (Oh et al., 2001). Naproti tomu Wang a kolektiv neobjevili žádnou změnu v expresi NR1 podjednotky v hipokampu potkanů po subchronické aplikaci PCP a detekovali pouze nárůst této podjednotky v předním mozku (Wang et al., 1999).

Zůstává otázkou, zda by významnější výsledky přineslo použití nižší dávky MK-801, případně zvolení jiného časového plánu, či jiných typů behaviorálních úloh jako je například test otevřeného pole, kde by se dala účinněji zkoumat hyperlokomoce zvířat. Také by bylo pro příští experimenty podobného typu vhodné zaměřit se spíše na starší věkové skupiny zvířat, jelikož detekovatelné změny

(pokud se nějaké projevíly) byly pozorovány spíše u kohorty PND 60, a u kmene Long-Evans. Tento závěr je v kontrastu se situacemi pozorovanými pro akutní aplikaci MK-801, kdy se naopak na kognitivní deficity a změny ukázali citlivější potkani kmene Wistar (Vales et al., 2006). Subchronická aplikace látek jako je MK-801 v adolescentním období vyvolává také obavy o následný správný rozvoj zvířat, nicméně v této práci nebyly pozorovány žádné negativní efekty na jejich fyzický vývoj. Došlo pouze k ovlivnění v rámci akutních behaviorálních stavů a u čtyř Long-Evans potkanů přetrvalo toto úzkostné, panické a agresivní chování až do dospělosti.

9. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo sledovat změny v neurobehaviorálních funkcích po dvoutýdenní subchronické aplikaci MK-801 a po odeznění jeho účinků u potkanů kmene Wistar a Long-Evans v adolescentním období (PND 30) a v období časně dospělosti (PND 60). Dále zjistit, jaké jsou po této experimentální manipulaci změny v expresi NR1, NR2A a NR2B podjednotek NMDA receptorů. A nakonec zhodnotit, zdali tato manipulace představuje prakticky použitelný animální model schizofrenii-podobného chování.

Změny v chování byly hodnoceny sérií behaviorálních testů – EPM pro zjištění anxiety a DMP verzí MWM a úlohy aktivního vyhýbání se místu pro posouzení prostorového navigačního učení. Změny v expresi podjednotek NMDA receptorů byly zkoumány pomocí Western blotů.

Analýza behaviorálních parametrů prokázala u adolescentních potkanů kmene Long-Evans zvýšenou anxiety v EPM a u skupiny s počátkem aplikace ve věku PND 60 zhoršenou pracovní paměť a navigaci v MWM. Zhoršení prostorové navigace bylo spojeno se sníženou expresí NR1 a NR2B podjednotky NMDA receptorů v hipokampu. U tohoto kmene potkanů byly také pozorovány dlouhodobé kvalitativní změny v chování jako agrese a panika. Účinky subchronické aplikace MK-801 však nebyly příliš zaznamenány u potkanů kmene Wistar. Ani u jednoho z kmenů nebyla v MWM a v úloze aktivního vyhýbání se místu zjištěna hyperlokomoce, což je možné vysvětlit špatně zvolenými typy testů pro detekci lokomoční aktivity, pro níž by byl zřejmě v tomto případě účinnější test otevřeného pole.

Výsledky získané v této práci dokládají, že je MK-801 schopen navodit některé dlouhodobé změny jak v chování, tak v biochemii, a to především u kmene Long-Evans. Pro budoucí studie představuje slibnou variantu animálního modelu schizofrenii-podobného chování především aplikace MK-801 tomuto kmeni od věku PND 60. Současně s tímto závěrem byly díky této práci rozšířeny dosavadní znalosti o dlouhodobých účincích MK-801 na chování a kognitivní změny zvířat v adolescentním období a v období časně dospělosti, které v literatuře zatím nejsou tak časté.

10. Seznam literatury

- Abdul-Monim Z., Reynolds G. P., Neill J. C. (2006). "The Effect of Atypical and Classical Antipsychotics on Sub-Chronic PCP-Induced Cognitive Deficits in a Reversal-Learning Paradigm." *Behavioural Brain Research* 169 (2): 263-73.
- Adams B., Moghaddam B. (1998). "Corticolimbic Dopamine Neurotransmission Is Temporally Dissociated from the Cognitive and Locomotor Effects of Phencyclidine." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (14): 5545-54.
- Akaike N., Himori N. (1993). "Antagonism of Various Tonic Convulsions in Mice by Dextrorphan and Dizocilpine." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 347 (6): 652-57.
- Andiné P., Widermark N., Axelsson R., Nyberg G., Olofsson U., Mårtensson E., Sandberg M. (1999). "Characterization of MK-801-Induced Behavior as a Putative Rat Model of Psychosis." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290 (3): 1393-1408.
- Andreasen N. C. (1995). "Symptoms, Signs, and Diagnosis of Schizophrenia." *Lancet* 346 (8973): 477-81.
- Andreasen N. C., Olsen S. (1982). "Negative v Positive Schizophrenia. Definition and Validation." *Archives of General Psychiatry* 39 (7): 789-94.
- Angrist B. M., Gershon S. (1970). "The Phenomenology of Experimentally Induced Amphetamine Psychosis--Preliminary Observations." *Biological Psychiatry* 2 (2): 95-107.
- Anis N. A., Berry S.C., Burton N.R., Lodge D. (1983). "The Dissociative Anaesthetics, Ketamine and Phencyclidine, Selectively Reduce Excitation of Central Mammalian Neurones by N-Methyl-Aspartate." *British Journal of Pharmacology* 79 (2): 565-75.
- Apland J. P., Cann F.J. (1995). "Anticonvulsant Effects of Memantine and MK-801 in Guinea Pig Hippocampal Slices." *Brain Research Bulletin* 37 (3): 311-16.
- Arranz M. J., Munro J., Sham P., Kirov G., Murray R. M., Collier D.A., Kerwin R.W. (1998). "Meta-Analysis of Studies on Genetic Variation in 5-HT_{2A} Receptors and Clozapine Response." *Schizophrenia Research* 32 (2): 93-99.
- Arundine M., Tymianski M. (2003). "Molecular Mechanisms of Calcium-Dependent Neurodegeneration in Excitotoxicity." *Cell Calcium* 34 (4-5): 325-37.
- Baier P. C., Blume A., Koch J., Marx A., Fritzer G., Aldenhoff J.B., Schiffelholz T. (2009). "Early Postnatal Depletion of NMDA Receptor Development Affects Behaviour and NMDA Receptor Expression until Later Adulthood in Rats--a Possible Model for Schizophrenia." *Behavioural Brain Research* 205 (1): 96-101.
- Ballard T. M., Pauly-Evers M., Higgins G. A., Ouagazzal A.-M., Mutel V., Borroni E., Kemp J.A., Bluethmann H., Kew J.N.C. (2002). "Severe Impairment of NMDA Receptor Function in Mice Carrying Targeted Point Mutations in the Glycine Binding Site Results in Drug-Resistant Nonhabituating Hyperactivity." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (15): 6713-23.
- Barkus Ch., McHugh S.B., Sprengel R., Seeburg P.H., Rawlins J.N.P., Bannerman D.M. (2010). "Hippocampal NMDA Receptors and Anxiety: At the Interface between Cognition and Emotion." *European Journal of Pharmacology* 626 (1): 49-56.

- Battaglia G., Monn J. A., Schoepp D. D. (1997). "In Vivo Inhibition of Veratridine-Evoked Release of Striatal Excitatory Amino Acids by the Group II Metabotropic Glutamate Receptor Agonist LY354740 in Rats." *Neuroscience Letters* 229 (3): 161–64.
- Becker A., Peters B., Schroeder H., Mann T., Huether G., Grecksch G. (2003). "Ketamine-Induced Changes in Rat Behaviour: A Possible Animal Model of Schizophrenia." *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27 (4): 687–700.
- Behar T. N., Scott C. A., Greene C. L., Wen X., Smith S. V., Maric D., Liu Q. Y., Colton C. A., Barker J. L. (1999). "Glutamate Acting at NMDA Receptors Stimulates Embryonic Cortical Neuronal Migration." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (11): 4449–61.
- Bender C., de Olmos S., Bueno A., de Olmos J., Lorenzo A. (2010). "Comparative Analyses of the Neurodegeneration Induced by the Non-Competitive NMDA-Receptor-Antagonist Drug MK801 in Mice and Rats." *Neurotoxicology and Teratology* 32 (5): 542–50.
- Beninger R. J., Jhamandas A., Aujla H., Xue L., Dagnone R. V., Boegman R. J., Jhamandas K. (2002). "Neonatal Exposure to the Glutamate Receptor Antagonist MK-801: Effects on Locomotor Activity and Pre-Pulse Inhibition before and after Sexual Maturity in Rats." *Neurotoxicity Research* 4 (5–6): 477–88.
- Bonfoco E., Krainc D., Ankarcrona M., Nicotera P., Lipton S. A. (1995). "Apoptosis and Necrosis: Two Distinct Events Induced, Respectively, by Mild and Intense Insults with N-Methyl-D-Aspartate or Nitric Oxide/superoxide in Cortical Cell Cultures." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (16): 7162–66.
- Bora E., Murray R.M. (2014). "Meta-Analysis of Cognitive Deficits in Ultra-High Risk to Psychosis and First-Episode Psychosis: Do the Cognitive Deficits Progress Over, or After, the Onset of Psychosis?" *Schizophrenia Bulletin* 40 (4): 744–55.
- Braff D. L., Geyer M. A. (1980). "Acute and Chronic LSD Effects on Rat Startle: Data Supporting an LSD-Rat Model of Schizophrenia." *Biological Psychiatry* 15 (6): 909–16.
- Bubeníková-Valesová V., Horáček J., Vrajová M., Höschl C. (2008). "Models of Schizophrenia in Humans and Animals Based on Inhibition of NMDA Receptors." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32 (5): 1014–23.
- Bures J., Fenton A. A., Kaminsky Y., Zinyuk L. (1997). "Place Cells and Place Navigation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1): 343–50.
- Burnet P. W., Eastwood S. L., Harrison P. J. (1996). "5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} Receptor mRNAs and Binding Site Densities Are Differentially Altered in Schizophrenia." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 15 (5): 442–55.
- Cameron H. A., Gould E. (1994). "Adult Neurogenesis Is Regulated by Adrenal Steroids in the Dentate Gyrus." *Neuroscience* 61 (2): 203–9.
- Carlsson A., Lindqvist M. (1963). "Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3-methoxytyramine And Normetanephrine in Mouse Brain." *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 20: 140–44.
- Chenu C., Serre C. M., Raynal C., Burt-Pichat B., Delmas P. D. (1998). "Glutamate Receptors Are Expressed by Bone Cells and Are Involved in Bone Resorption." *Bone* 22 (4): 295–99.

- Cimadevilla J. M., Fenton A. A., Bures J. (2000). "Functional Inactivation of Dorsal Hippocampus Impairs Active Place Avoidance in Rats." *Neuroscience Letters* 285 (1): 53–56.
- Cimadevilla J. M., Wesierska M., Fenton A. A., Bures J. (2001). "Inactivating One Hippocampus Impairs Avoidance of a Stable Room-Defined Place during Dissociation of Arena Cues from Room Cues by Rotation of the Arena." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (6): 3531–36.
- Clements J. D., Lester R. A., Tong G., Jahr C. E., Westbrook G. L. (1992). "The Time Course of Glutamate in the Synaptic Cleft." *Science (New York, N.Y.)* 258 (5087): 1498–1501.
- Clinton S. M., Meador-Woodruff J. H. (2004). "Abnormalities of the NMDA Receptor and Associated Intracellular Molecules in the Thalamus in Schizophrenia and Bipolar Disorder." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29 (7): 1353–62.
- Collingridge G. L., Kehl S. J., McLennan H. (1983). "Excitatory Amino Acids in Synaptic Transmission in the Schaffer Collateral-Commissural Pathway of the Rat Hippocampus." *The Journal of Physiology* 334 (January): 33–46.
- Colwell C. S., Cepeda C., Crawford C., Levine M. S. (1998). "Postnatal Development of Glutamate Receptor-Mediated Responses in the Neostriatum." *Developmental Neuroscience* 20 (2–3): 154–63.
- Corbett R., Camacho F., Woods A. T., Kerman L. L., Fishkin R. J., Brooks K., Dunn R. W. (1995). "Antipsychotic Agents Antagonize Non-Competitive N-Methyl-D-Aspartate Antagonist-Induced Behaviors." *Psychopharmacology* 120 (1): 67–74.
- Cotman C. W., Monaghan D. T., Ottersen O. P., Storm-Mathisen J. (1987). "Anatomical Organization of Excitatory Amino Acid Receptors and Their Pathways." *Trends in Neurosciences* 10 (7): 273–80.
- Csernansky J. G., Martin M., Shah R., Bertchume A., Colvin J., Dong H. (2005). "Cholinesterase Inhibitors Ameliorate Behavioral Deficits Induced by MK-801 in Mice." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 30 (12): 2135–43.
- Das S., Sasaki Y. F., Rothe T., Premkumar L. S., Takasu M., Crandall J. E., Dikkes P. (1998). "Increased NMDA Current and Spine Density in Mice Lacking the NMDA Receptor Subunit NR3A." *Nature* 393 (6683): 377–81.
- Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S. F. (1999). "The Glutamate Receptor Ion Channels." *Pharmacological Reviews* 51 (1): 7–61.
- Dobbing J., Sands J. (1979). "Comparative Aspects of the Brain Growth Spurt." *Early Human Development* 3 (1): 79–83.
- Done D. J., Crow T. J., Johnstone E. C., Sacker A. (1994). "Childhood Antecedents of Schizophrenia and Affective Illness: Social Adjustment at Ages 7 and 11." *BMJ (Clinical Research Ed.)* 309 (6956): 699–703.
- du Bois T. M., Huang X.-F. (2007). "Early Brain Development Disruption from NMDA Receptor Hypofunction: Relevance to Schizophrenia." *Brain Research Reviews* 53 (2): 260–70.
- Elhardt M., Martinez L., Tejada-Simon M. (2010). "Neurochemical, Behavioral and Architectural Changes after Chronic Inactivation of NMDA Receptors in Mice." *Neuroscience Letters* 468 (2): 166–71.

- Engin E., Treit D., Dickson C. T. (2009). "Anxiolytic- and Antidepressant-like Properties of Ketamine in Behavioral and Neurophysiological Animal Models." *Neuroscience* 161 (2): 359–69.
- Facchinetti F., Ciani E., Dall'Olio R., Virgili M., Contestabile A., Fonnum F. (1993). "Structural, Neurochemical and Behavioural Consequences of Neonatal Blockade of NMDA Receptor through Chronic Treatment with CGP 39551 or MK-801." *Brain Research. Developmental Brain Research* 74 (2): 219–24.
- Fenton A. A., Wesierska M., Kaminsky Y., Bures J. (1998). "Both Here and There: Simultaneous Expression of Autonomous Spatial Memories in Rats." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (19): 11493–98.
- File S. E., Lippa A.S., Beer B., Lippa M.T., (2004). "Animal Tests of Anxiety." *Current Protocols in Neuroscience* Chapter 8 (May): Unit 8.3.
- Folbergrová J., Haugvicová R., Mares P. (2000). "Behavioral and Metabolic Changes in Immature Rats during Seizures Induced by Homocysteic Acid: The Protective Effect of NMDA and Non-NMDA Receptor Antagonists." *Experimental Neurology* 161 (1): 336–45.
- Fraser C. M., Cooke M. J., Fisher A., Thompson I. D., Stone T. W. (1996). "Interactions between Ifenprodil and Dizocilpine on Mouse Behaviour in Models of Anxiety and Working Memory." *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 6 (4): 311–16.
- Gaddum J. H., Hameed K. A. (1954). "Drugs Which Antagonize 5-Hydroxytryptamine." *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 9 (2): 240–48.
- Gao X. M., Sakai K., Roberts R. C., Conley R. R., Dean B., Tamminga C. A. (2000). "Ionotropic Glutamate Receptors and Expression of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunits in Subregions of Human Hippocampus: Effects of Schizophrenia." *The American Journal of Psychiatry* 157 (7): 1141–49.
- Genius J., Geiger J., Dölzer A.-L., Benninghoff J., Giegling I., Hartmann A.M., Möller H.-J., Rujescu D. (2013). "Glutamatergic Dysbalance and Oxidative Stress in in Vivo and in Vitro Models of Psychosis Based on Chronic NMDA Receptor Antagonism." *PloS One* 8 (7): e59395.
- Geyer M. A., Krebs-Thomson K., Braff D. L., Swerdlow N. R. (2001). "Pharmacological Studies of Prepulse Inhibition Models of Sensorimotor Gating Deficits in Schizophrenia: A Decade in Review." *Psychopharmacology* 156 (2–3): 117–54.
- Geyer M. A., Moghaddam, B. (2002.) "Animal Models Relevant to Schizophrenia Disorders." *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, 689-701."
- Gilbert M. E. (1988). "The NMDA-Receptor Antagonist, MK-801, Suppresses Limbic Kindling and Kindled Seizures." *Brain Research* 463 (1): 90–99.
- Gill S. S., Pulido O. M., Mueller R. W., McGuire P. F. (1998). "Molecular and Immunochemical Characterization of the Ionotropic Glutamate Receptors in the Rat Heart." *Brain Research Bulletin* 46 (5): 429–34.
- Gold S., Arndt S., Nopoulos P., O'Leary D. S., Andreasen N. C. (1999). "Longitudinal Study of Cognitive Function in First-Episode and Recent-Onset Schizophrenia." *The American Journal of Psychiatry* 156 (9): 1342–48.
- Gorter J. A., de Bruin J. P. (1992). "Chronic Neonatal MK-801 Treatment Results in an Impairment of Spatial Learning in the Adult Rat." *Brain Research* 580 (1–2): 12–17.

- Guo C., Yang Y., Su Y., Si T. (2010). "Postnatal BDNF Expression Profiles in Prefrontal Cortex and Hippocampus of a Rat Schizophrenia Model Induced by MK-801 Administration." *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2010: 783297.
- Hagger C., Buckley P., Kenny J. T., Friedman L., Ubogy D., Meltzer H. Y. (1993). "Improvement in Cognitive Functions and Psychiatric Symptoms in Treatment-Refractory Schizophrenic Patients Receiving Clozapine." *Biological Psychiatry* 34 (10): 702–12.
- Hargreaves E. L., Cain D. P. (1995). "MK801-Induced Hyperactivity: Duration of Effects in Rats." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 51 (1): 13–19.
- Harris L. W., Sharp T., J. Gartlon, Jones D. N. C., Harrison P. J. (2003a). "Long-Term Behavioural, Molecular and Morphological Effects of Neonatal NMDA Receptor Antagonism." *The European Journal of Neuroscience* 18 (6): 1706–10.
- Harris L. W., Sharp T., J. Gartlon, Jones D. N. C., Harrison P. J. (2003b). "Long-Term Behavioural, Molecular and Morphological Effects of Neonatal NMDA Receptor Antagonism." *The European Journal of Neuroscience* 18 (6): 1706–10.
- Harrison P. J., Law A. J. (2006). "Neuregulin 1 and Schizophrenia: Genetics, Gene Expression, and Neurobiology." *Biological Psychiatry* 60 (2): 132–40.
- Hashimoto T., Volk D. W., Eggan S. M., Mirnics K., Pierri J.N., Sun Z., Sampson A. R., Lewis D. A. (2003). "Gene Expression Deficits in a Subclass of GABA Neurons in the Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (15): 6315–26.
- Heinrichs R. W., Zakzanis K. K. (1998). "Neurocognitive Deficit in Schizophrenia: A Quantitative Review of the Evidence." *Neuropsychology* 12 (3): 426–45.
- Hollmann M., Heinemann S. (1994). "Cloned Glutamate Receptors." *Annual Review of Neuroscience* 17 (1): 31–108.
- Homayoun H., Stefani M. R., Adams B. W., Tamagan G. D., Moghaddam B. (2004). "Functional Interaction Between NMDA and mGlu5 Receptors: Effects on Working Memory, Instrumental Learning, Motor Behaviors, and Dopamine Release." *Neuropsychopharmacology* 29 (7): 1259–69.
- Ibrahim H. M., Hogg A. J., Healy D. J., Haroutunian V., Davis K. L., Meador-Woodruff J. H. (2000). "Ionotropic Glutamate Receptor Binding and Subunit mRNA Expression in Thalamic Nuclei in Schizophrenia." *The American Journal of Psychiatry* 157 (11): 1811–23.
- Ikonomidou C., Bosch F., Miksa M., Bittigau P., Vöckler J., Dikranian K., Tenkova T. I., Stefovská V., Turski L., Olney J. W. (1999). "Blockade of NMDA Receptors and Apoptotic Neurodegeneration in the Developing Brain." *Science (New York, N.Y.)* 283 (5398): 70–74.
- Inagaki N., Kuromi H., Gono T., Okamoto Y., Ishida H., Seino Y., Kaneko T., Iwanaga T., Seino S. (1995). "Expression and Role of Ionotropic Glutamate Receptors in Pancreatic Islet Cells." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (8): 686–91.
- Itoh J., Nabeshima T., Kameyama T. (1991). "Utility of an Elevated plus-Maze for Dissociation of Amnesic and Behavioral Effects of Drugs in Mice." *European Journal of Pharmacology* 194 (1): 71–76.
- Japha K., Koch M. (1999). "Picrotoxin in the Medial Prefrontal Cortex Impairs Sensorimotor Gating in Rats: Reversal by Haloperidol." *Psychopharmacology* 144 (4): 347–54.

- Javitt D. C., Zukin S. R. (1991). "Recent Advances in the Phencyclidine Model of Schizophrenia." *The American Journal of Psychiatry* 148 (10): 1301–8.
- Jentsch J. D., Redmond Jr D. E., Elsworth J. D., Taylor J. R., Youngren K. D., Roth R. H. (1997). "Enduring Cognitive Deficits and Cortical Dopamine Dysfunction in Monkeys after Long-Term Administration of Phencyclidine." *Science (New York, N.Y.)* 277 (5328): 953–55.
- Jentsch J. D., Taylor J. R., Roth R. H. (1998). "Subchronic Phencyclidine Administration Increases Mesolimbic Dopaminergic System Responsivity and Augments Stress- and Psychostimulant-Induced Hyperlocomotion." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 19 (2): 105–13.
- Jones C.A., Watson D.J.G., Fone K.C.F. (2011). "Animal Models of Schizophrenia." *British Journal of Pharmacology* 164 (4): 1162–94.
- Joyce J. N., Shane A., Lexow N., Winokur A., Casanova M. F., Kleinman J. E. (1993). "Serotonin Uptake Sites and Serotonin Receptors Are Altered in the Limbic System of Schizophrenics." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 8 (4): 315–36.
- Keith V. A., Mansbach R. S., Geyer M. A. (1991). "Failure of Haloperidol to Block the Effects of Phencyclidine and Dizocilpine on Prepulse Inhibition of Startle." *Biological Psychiatry* 30 (6): 557–66.
- Kendler K.S., Gruenberg A.M., Tsuang M.T. (1985). "Psychiatric Illness in First-Degree Relatives of Schizophrenic and Surgical Control Patients: A Family Study Using Dsm-Iii Criteria." *Archives of General Psychiatry* 42 (8): 770–79.
- Kerwin R., Patel S., Meldrum B. (1990). "Quantitative Autoradiographic Analysis of Glutamate Binding Sites in the Hippocampal Formation in Normal and Schizophrenic Brain Post Mortem." *Neuroscience* 39 (1): 25–32.
- Kew J. N. C., Kemp J. A. (2005). "Ionotropic and Metabotropic Glutamate Receptor Structure and Pharmacology." *Psychopharmacology* 179 (1): 4–29.
- Kim J. S., Kornhuber H. H., Schmid-Burgk W., Holzmüller B. (1980). "Low Cerebrospinal Fluid Glutamate in Schizophrenic Patients and a New Hypothesis on Schizophrenia." *Neuroscience Letters* 20 (3): 379–82.
- Kjelstrup K.G., Tuvnes F. A., Steffenach H.-A., Murison R., Moser E. I., Moser M.-B. (2002). "Reduced Fear Expression after Lesions of the Ventral Hippocampus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (16): 10825–30.
- Kocahan S., Akillioglu K., Binokay S., Sencar L., Polat S. (2013). "The Effects of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Blockade During The Early Neurodevelopmental Period on Emotional Behaviors and Cognitive Functions of Adolescent Wistar Rats." *Neurochemical Research* 38 (5): 989–96.
- Kornhuber J., Mack-Burkhardt F., Riederer P., Hebenstreit G. F., Reynolds G. P., Andrews H. B., Beckmann H. (1989). "[3H]MK-801 Binding Sites in Postmortem Brain Regions of Schizophrenic Patients." *Journal of Neural Transmission* 77 (2–3): 231–36.
- Kristiansen L. V., Huerta I., Beneyto M., Meador-Woodruff J. H. (2007). "NMDA Receptors and Schizophrenia." *ResearchGate* 7 (1): 48–55.
- Krystal J. H., D'Souza D. C., Petrakis I. L., Belger A., Berman R. M., Charney D. S., Abi-Saab W., Madonick S. (1999). "NMDA Agonists and Antagonists as Probes of Glutamatergic Dysfunction

- and Pharmacotherapies in Neuropsychiatric Disorders.” *Harvard Review of Psychiatry* 7 (3): 125–43.
- Krystal J. H., Karper L. P., Seibyl J. P., Freeman G. K., Delaney R., Bremner J. D., Heninger G. R., Bowers M. B., Charney D. S. (1994). “Subanesthetic Effects of the Noncompetitive NMDA Antagonist, Ketamine, in Humans. Psychotomimetic, Perceptual, Cognitive, and Neuroendocrine Responses.” *Archives of General Psychiatry* 51 (3): 199–214.
- Kubík S., Fenton A. A. (2005). “Behavioral Evidence That Segregation and Representation Are Dissociable Hippocampal Functions.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (40): 9205–12.
- Lahti A. C., Koffel B., LaPorte D., Tamminga C. A. (1995). “Subanesthetic Doses of Ketamine Stimulate Psychosis in Schizophrenia.” *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 13 (1): 9–19.
- Latysheva N. V., Rayevsky K. S. (2003). “Chronic Neonatal N-Methyl-D-Aspartate Receptor Blockade Induces Learning Deficits and Transient Hypoactivity in Young Rats.” *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27 (5): 787–94.
- Law A. J., Deakin J. F. (2001). “Asymmetrical Reductions of Hippocampal NMDAR1 Glutamate Receptor mRNA in the Psychoses.” *Neuroreport* 12 (13): 2971–74.
- Lehrer D. S., Christian B. T., Mantil J., Murray A. C., Buchsbaum B. R., Oakes T. R., Byne W., Kemether E. M., Buchsbaum M. S. (2005). “Thalamic and Prefrontal FDG Uptake in Never Medicated Patients with Schizophrenia.” *The American Journal of Psychiatry* 162 (5): 931–38.
- Lewis D. A., Anderson S. A. (1995). “The Functional Architecture of the Prefrontal Cortex and Schizophrenia.” *Psychological Medicine* 25 (5): 887–94.
- Li J.-T., Su Y.-A., Guo C.-M., Feng Y., Yang Y., Huang R.-H., Si T.-M. (2011). “Persisting Cognitive Deficits Induced by Low-Dose, Subchronic Treatment with MK-801 in Adolescent Rats.” *ResearchGate* 652 (1–3): 65–72.
- Lim A. L., Taylor D. A., Malone D.T. (2012). “Consequences of Early Life MK-801 Administration: Long-Term Behavioural Effects and Relevance to Schizophrenia Research.” *Behavioural Brain Research* 227 (1): 276–86.
- Lipska B. K., Weinberger D. R. (1993). “Delayed Effects of Neonatal Hippocampal Damage on Haloperidol-Induced Catalepsy and Apomorphine-Induced Stereotypic Behaviors in the Rat.” *Brain Research. Developmental Brain Research* 75 (2): 213–22.
- Lipska B. K., Weinberger D. R. (2000). “To Model a Psychiatric Disorder in Animals: Schizophrenia as a Reality Test.” *Neuropsychopharmacology* 23 (3): 223–39.
- Lipska B. K. (2004). “Using Animal Models to Test a Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia.” *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 29 (4): 282–86.
- Liu W., Wang X., Hong W., Wang D., Chen X. (2017). “Establishment of a Schizophrenic Animal Model through Chronic Administration of MK-801 in Infancy and Social Isolation in Childhood.” *Infant Behavior and Development* 46 (February): 135–43.
- Lobelova V., Entlerova M., Svojanovska B., Hatalova H., Prokopova I., Petrasek T., Vales K., Kubik S., Fajnerova I., Stuchlik A. (2013). “Two Learning Tasks Provide Evidence for Disrupted Behavioural Flexibility in an Animal Model of Schizophrenia-like Behaviour Induced by Acute MK-801: A Dose-Response Study.” *Behavioural Brain Research* 246 (June): 55–62.

- Luby E. D., Cohen B. D., Rosenbaum G., Gottlieb J. S., Kelley R. (1959). "Study of a New Schizophrenomimetic Drug; Sernyl." *A.M.A. Archives of Neurology and Psychiatry* 81 (3): 363–69.
- Lukoyanov N. V., Paula-Barbosa M. M. (2000a). "A Single High Dose of Dizocilpine Produces Long-Lasting Impairment of the Water Maze Performance in Adult Rats." *Neuroscience Letters* 285 (2): 139–42.
- Lukoyanov N. V., Paula-Barbosa M. M. (2000b). "A Single High Dose of Dizocilpine Produces Long-Lasting Impairment of the Water Maze Performance in Adult Rats." *Neuroscience Letters* 285 (2): 139–42.
- Macciardi F., Lucca A., Catalano M., Marino C., Zanardi R., Smeraldi E. (1990). "Amino Acid Patterns in Schizophrenia: Some New Findings." *Psychiatry Research* 32 (1): 63–70.
- Mallett R., Leff J., Bhugra D., Pang D., Zhao J. H. (2002). "Social Environment, Ethnicity and Schizophrenia. A Case-Control Study." *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology* 37 (7): 329–35.
- Marcotte E. R., Pearson D. M., Srivastava L. K. (2001). "Animal Models of Schizophrenia: A Critical Review." *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 26 (5): 395–410.
- Marder S. R., Fenton W. (2004). "Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia: NIMH MATRICS Initiative to Support the Development of Agents for Improving Cognition in Schizophrenia." *Schizophrenia Research* 72 (1): 5–9.
- Mathé J. M., Nomikos G. G., Schilström B., Svensson T. H. (1998). "Non-NMDA Excitatory Amino Acid Receptors in the Ventral Tegmental Area Mediate Systemic Dizocilpine (MK-801) Induced Hyperlocomotion and Dopamine Release in the Nucleus Accumbens." *Journal of Neuroscience Research* 51 (5): 583–92.
- McCullumsmith R. E., Meador-Woodruff J. H. (2002). "Striatal Excitatory Amino Acid Transporter Transcript Expression in Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Major Depressive Disorder." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 26 (3): 368–75.
- McGurk S. R., Twamley E. W., Sitzler D. I., McHugo G. J., Mueser K. T. (2007). "A Meta-Analysis of Cognitive Remediation in Schizophrenia." *The American Journal of Psychiatry* 164 (12): 1791–1802.
- McLamb R. L., Williams L. R., Nanry K. P., Wilson W. A., Tilson H. A. (1990). "MK-801 Impedes the Acquisition of a Spatial Memory Task in Rats." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 37 (1): 41–45.
- Meltzer H. Y., Matsubara S., Lee J. C. (1989). "Classification of Typical and Atypical Antipsychotic Drugs on the Basis of Dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi Values." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 251 (1): 238–46.
- Minzenberg M. J., Laird A. R., Thelen S., Carter C. S., Glahn D. C. (2009). "Meta-Analysis of 41 Functional Neuroimaging Studies of Executive Function in Schizophrenia." *Archives of General Psychiatry* 66 (8): 811–22.
- Moghaddam B., Adams B. W., Verma A., Daly D. (1997). "Activation of Glutamatergic Neurotransmission by Ketamine: A Novel Step in the Pathway from NMDA Receptor Blockade to Dopaminergic and Cognitive Disruptions Associated with the Prefrontal Cortex." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (8): 2921–27.

- Moghaddam B., Adams B.W. (1998). "Reversal of Phencyclidine Effects by a Group II Metabotropic Glutamate Receptor Agonist in Rats." *Science (New York, N.Y.)* 281 (5381): 1349–52.
- Moghaddam B. (2004). "Targeting Metabotropic Glutamate Receptors for Treatment of the Cognitive Symptoms of Schizophrenia." *Psychopharmacology* 174 (1): 39–44.
- Mohn A. R., Gainetdinov R. R., Caron M. G., Koller B. H. (1999). "Mice with Reduced NMDA Receptor Expression Display Behaviors Related to Schizophrenia." *Cell* 98 (4): 427–36.
- Moore H., Jentsch J. D., Ghajarnia M., Geyer M. A., Grace A. A. (2006). "A Neurobehavioral Systems Analysis of Adult Rats Exposed to Methylazoxymethanol Acetate on E17: Implications for the Neuropathology of Schizophrenia." *Biological Psychiatry* 60 (3): 253–64.
- Morris R. (1984). "Developments of a Water-Maze Procedure for Studying Spatial Learning in the Rat." *Journal of Neuroscience Methods* 11 (1): 47–60.
- Morris R. G., Garrud P., Rawlins J. N., O'Keefe J. (1982). "Place Navigation Impaired in Rats with Hippocampal Lesions." *Nature* 297 (5868): 681–83.
- Morris R. G. (1981). "Spatial Localization Does Not Require the Presence of Local Cues." *Learning and Motivation* 12 (2): 239–60.
- Müller T., Grosche J., Ohlemeyer C., Kettenmann H. (1993). "NMDA-Activated Currents in Bergmann Glial Cells." *Neuroreport* 4 (6): 671–74.
- Németh H., Varga H., Farkas T., Kis Z., Vécsei L., Horváth S., Boda K., Wolff J. R., Toldi J. (2002). "Long-Term Effects of Neonatal MK-801 Treatment on Spatial Learning and Cortical Plasticity in Adult Rats." *Psychopharmacology* 160 (1): 1–8.
- Nemoto T., Niimura H., Ryu Y., Sakuma K., Mizuno M. (2014). "Long-Term Course of Cognitive Function in Chronically Hospitalized Patients with Schizophrenia Transitioning to Community-Based Living." *Schizophrenia Research* 155 (1–3): 90–95.
- Nguyen L., Rigo J. M., Rocher V., Belachew S., Malgrange B., Rogister B., Leprince P., Moonen G. 2001. "Neurotransmitters as Early Signals for Central Nervous System Development." *Cell and Tissue Research* 305 (2): 187–202.
- Nishi M., Hinds H., Lu H. P., Kawata M., Hayashi Y. (2001). "Motoneuron-Specific Expression of NR3B, a Novel NMDA-Type Glutamate Receptor Subunit That Works in a Dominant-Negative Manner." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (23): RC185.
- Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A., Prochiantz A. (1984). "Magnesium Gates Glutamate-Activated Channels in Mouse Central Neurones." *Nature* 307 (5950): 462–65.
- O'Donnell P., Grace A. A. (1998). "Phencyclidine Interferes with the Hippocampal Gating of Nucleus Accumbens Neuronal Activity in Vivo." *Neuroscience* 87 (4): 823–30.
- Oh S., Kim Y. H., Hann H. J., Lee H. L., Choi H. S., Kim H. S., Ho I.K. (2001). "Modulation of the Levels of NMDA Receptor Subunit mRNA and the Bindings of [3H]MK-801 in Rat Brain by Chronic Infusion of Subtoxic Dose of MK-801." *Neurochemical Research* 26 (5): 559–65.
- Ohno M., Watanabe S. (1996). "Interactive Processing between Glutamatergic and Cholinergic Systems Involved in Inhibitory Avoidance Learning of Rats." *European Journal of Pharmacology* 312 (2): 145–47.

- Olney J. W., Farber N. B. (1995). "Glutamate Receptor Dysfunction and Schizophrenia." *Archives of General Psychiatry* 52 (12): 998–1007.
- Olney J. W., Labruyere J., Price M. T. (1989). "Pathological Changes Induced in Cerebrocortical Neurons by Phencyclidine and Related Drugs." *Science (New York, N.Y.)* 244 (4910): 1360–62.
- Olney J. W., Labruyere J., Wang G., Wozniak D. F., Price M. T., Sesma M. A. (1991). "NMDA Antagonist Neurotoxicity: Mechanism and Prevention." *Science (New York, N.Y.)* 254 (5037): 1515–18.
- Ozaki M., Sasner M., Yano R., Lu H. S., Buonanno A. (1997). "Neuregulin-Beta Induces Expression of an NMDA-Receptor Subunit." *Nature* 390 (6661): 691–94.
- Ozyurt E., Graham D. I., Woodruff G. N., McCulloch J. (1988). "Protective Effect of the Glutamate Antagonist, MK-801 in Focal Cerebral Ischemia in the Cat." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 8 (1): 138–43.
- Palmer B. W., Heaton R. K., Paulsen J. S., Kuck J., Braff D., Harris M. J., Zisook S., Jeste D. V. (1997). "Is It Possible to Be Schizophrenic yet Neuropsychologically Normal?" *Neuropsychology* 11 (3): 437–46.
- Patneau D. K., Mayer M. L. (1990). "Structure-Activity Relationships for Amino Acid Transmitter Candidates Acting at N-Methyl-D-Aspartate and Quisqualate Receptors." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 10 (7): 2385–99.
- Pearce I. A., Cambray-Deakin M. A., Burgoyne R. D. (1987). "Glutamate Acting on NMDA Receptors Stimulates Neurite Outgrowth from Cerebellar Granule Cells." *FEBS Letters* 223 (1): 143–47.
- Pellow S., Chopin P., File S. E., Briley M. (1985). "Validation of Open:closed Arm Entries in an Elevated plus-Maze as a Measure of Anxiety in the Rat." *Journal of Neuroscience Methods* 14 (3): 149–67.
- Penadés R., Pujol N., Catalán R., Massana G., Rametti G., García-Rizo C., Bargalló N., Gastó C., Bernardo M., Junqué C. (2013). "Brain Effects of Cognitive Remediation Therapy in Schizophrenia: A Structural and Functional Neuroimaging Study." *Biological Psychiatry* 73 (10): 1015–23.
- Peterson E.R. (1977). "A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable." *Analytical biochemistry*, 83: 346-56.
- Petralia R. S., Yokotani N., Wenthold R. J. (1994). "Light and Electron Microscope Distribution of the NMDA Receptor Subunit NMDAR1 in the Rat Nervous System Using a Selective Anti-Peptide Antibody." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 14 (2): 667–96.
- Phillips T., Rees S., Augood S., Waldvogel H., Faull R., Svendsen C., Emson P. (2000). "Localization of Metabotropic Glutamate Receptor Type 2 in the Human Brain." *Neuroscience* 95 (4): 1139–56.
- Phillips W. A., Silverstein S. M. (2003). "Convergence of Biological and Psychological Perspectives on Cognitive Coordination in Schizophrenia." *The Behavioral and Brain Sciences* 26 (1): 65-82-137.
- Pitkänen M., Sirviö J., MacDonald E., Niemi S., Ekonsalo T., Riekkinen Sr. P. (1995). "The Effects of D-Cycloserine and MK-801 on the Performance of Rats in Two Spatial Learning and Memory Tasks." *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 5 (4): 457–63.

- Pouget P., Wattiez N., Rivaud-Péchoix S., Gaymard B. (2010). "Rapid Development of Tolerance to Sub-Anaesthetic Dose of Ketamine: An Oculomotor Study in Macaque Monkeys." *Psychopharmacology* 209 (4): 313–18.
- Ratajczak P., Wozniak A., Nowakowska E. (2013). "Animal Models of Schizophrenia: Developmental Preparation in Rats." *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 73 (4): 472–84.
- Razoux F., Garcia R., Léna I. (2007). "Ketamine, at a Dose That Disrupts Motor Behavior and Latent Inhibition, Enhances Prefrontal Cortex Synaptic Efficacy and Glutamate Release in the Nucleus Accumbens." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32 (3): 719–27.
- Reif A., Fritzen S., Finger M., Strobel A., Lauer M., Schmitt A., Lesch K.-P. (2006). "Neural Stem Cell Proliferation Is Decreased in Schizophrenia, but Not in Depression." *Molecular Psychiatry* 11 (5): 514–22.
- Reimherr F. W., Wood D. R., Wender P. H. (1986). "The Use of MK-801, a Novel Sympathomimetic, in Adults with Attention Deficit Disorder, Residual Type." *Psychopharmacology Bulletin* 22 (1): 237–42.
- Robinson T. E., Becker J. B. (1986). "Enduring Changes in Brain and Behavior Produced by Chronic Amphetamine Administration: A Review and Evaluation of Animal Models of Amphetamine Psychosis." *Brain Research* 396 (2): 157–98.
- Romano C., Yang W. L., O'Malley K. L. (1996). "Metabotropic Glutamate Receptor 5 Is a Disulfide-Linked Dimer." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (45): 28612–16.
- Rosenmund C., Stern-Bach Y., Stevens C. F. (1998). "The Tetrameric Structure of a Glutamate Receptor Channel." *Science (New York, N.Y.)* 280 (5369): 1596–99.
- Rujescu D., Bender A., Keck M., Hartmann A. M., Ohl F., Raeder H., Giegling I. (2006). "A Pharmacological Model for Psychosis Based on N-Methyl-D-Aspartate Receptor Hypofunction: Molecular, Cellular, Functional and Behavioral Abnormalities." *Biological Psychiatry* 59 (8): 721–29.
- Sakimura K., Kutsuwada T., Ito I., Manabe T., Takayama C., Kushiya E., Yagi T. (1995). "Reduced Hippocampal LTP and Spatial Learning in Mice Lacking NMDA Receptor $\epsilon 1$ Subunit." *Nature* 373 (6510): 151–55.
- Sakurai T., Gamo N. J., Hikida T., Kim S.-H., Murai T., Tomoda T., Sawa A. (2015). "Converging Models of Schizophrenia--Network Alterations of Prefrontal Cortex Underlying Cognitive Impairments." *Progress in Neurobiology* 134 (November): 178–201.
- Sams-Dodd F. (1996). "Phencyclidine-Induced Stereotyped Behaviour and Social Isolation in Rats: A Possible Animal Model of Schizophrenia." *Behavioural Pharmacology* 7 (1): 3–23.
- Sartorius N., Jablensky A., Korten A., Ernberg G., Anker M., Cooper J. E., Day R. (1986). "Early Manifestations and First-Contact Incidence of Schizophrenia in Different Cultures. A Preliminary Report on the Initial Evaluation Phase of the WHO Collaborative Study on Determinants of Outcome of Severe Mental Disorders." *Psychological Medicine* 16 (4): 909–28.
- Schiffelholz T., Hinze-Selch D., Aldenhoff J.B. (2004). "Perinatal MK-801 Treatment Affects Age-Related Changes in Locomotor Activity from Childhood to Later Adulthood in Rats." *Neuroscience Letters* 360 (3): 157–60.

- Seeman P., Lee T. (1975). "Antipsychotic Drugs: Direct Correlation between Clinical Potency and Presynaptic Action on Dopamine Neurons." *Science (New York, N.Y.)* 188 (4194): 1217–19.
- Sherman A. D., Davidson A. T., Baruah S., Hegwood T. S., Waziri R. (1991). "Evidence of Glutamatergic Deficiency in Schizophrenia." *Neuroscience Letters* 121 (1–2): 77–80.
- Sircar R., Follesa P., Ticku M. K. (1996). "Postnatal Phencyclidine Treatment Differentially Regulates N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit mRNA Expression in Developing Rat Cerebral Cortex." *Brain Research. Molecular Brain Research* 40 (2): 214–20.
- Small S. A., Schobel S. A., Buxton R. B., Witter M. P., Barnes C. A. (2011). "A Pathophysiological Framework of Hippocampal Dysfunction in Ageing and Disease." *Nature Reviews. Neuroscience* 12 (10): 585–601.
- Snyder S. H. (1976). "The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Focus on the Dopamine Receptor." *The American Journal of Psychiatry* 133 (2): 197–202.
- Staay F., van der Josef, Rutten K., Erb C., Blokland A. (2011). "Effects of the Cognition Impairer MK-801 on Learning and Memory in Mice and Rats." *Behavioural Brain Research* 220 (1): 215–29.
- Steele R. J., Morris R. G. (1999). "Delay-Dependent Impairment of a Matching-to-Place Task with Chronic and Intrahippocampal Infusion of the NMDA-Antagonist D-AP5." *Hippocampus* 9 (2): 118–36.
- Stirling J., White C., Lewis S., Hopkins R., Tantam D., Huddy A., Montague L. (2003). "Neurocognitive Function and Outcome in First-Episode Schizophrenia: A 10-Year Follow-up of an Epidemiological Cohort." *Schizophrenia Research* 65 (2–3): 75–86.
- Strassman R. J., Qualls C. R., Berg L. M. (1996). "Differential Tolerance to Biological and Subjective Effects of Four Closely Spaced Doses of N,N-Dimethyltryptamine in Humans." *Biological Psychiatry* 39 (9): 784–95.
- Stuchlik A. (2003). "Space and Spatial Orientation." *ResearchGate* 52 (1): 22–33.
- Stuchlik A., Rezacova L., Vales K., Bubenikova V., Kubik S. (2004a). "Application of a Novel Active Allothetic Place Avoidance Task (AAPA) in Testing a Pharmacological Model of Psychosis in Rats: Comparison with the Morris Water Maze." *Neuroscience Letters* 366 (2): 162–66.
- Stuchlik A. (2004b). "Úlohy aktivního a pasivního vyhýbání se místu: slibné nástroje v kognitivních neurovědách." *Psychiatrie*. 2004, roč. 8, č. 1, s. 17–20. ISSN 1211-7579.
- Stuchlik A., Vales K. (2005). "Systemic Administration of MK-801, a Non-Competitive NMDA-Receptor Antagonist, Elicits a Behavioural Deficit of Rats in the Active Allothetic Place Avoidance (AAPA) Task Irrespective of Their Intact Spatial Pretraining." *Behavioural Brain Research* 159 (1): 163–71.
- Stuchlik A., Petrásek T., Prokopová I., Holubová K., Hatalová H., Valeš K., Kubík S., Dockery C., Wesierska M. (2013). "Place Avoidance Tasks as Tools in the Behavioral Neuroscience of Learning and Memory." *Physiological Research* 62 Suppl 1: S1–19.
- Susser E., Neugebauer R., Hoek H. W., Brown A. S., Lin S., Labovitz D., Gorman J. M. (1996). "Schizophrenia after Prenatal Famine. Further Evidence." *Archives of General Psychiatry* 53 (1): 25–31.
- Takahata R., Moghaddam B. (2003). "Activation of Glutamate Neurotransmission in the Prefrontal Cortex Sustains the Motoric and Dopaminergic Effects of Phencyclidine." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28 (6): 1117–24.

- Takei N., Mortensen P. B., Klaening U., Murray R. M., Sham P. C., O'Callaghan E., Munk-Jørgensen P. (1996). "Relationship between in Utero Exposure to Influenza Epidemics and Risk of Schizophrenia in Denmark." *Biological Psychiatry* 40 (9): 817–24.
- Tamaru Y., Nomura S., Mizuno N., Shigemoto R. (2001). "Distribution of Metabotropic Glutamate Receptor mGluR3 in the Mouse CNS: Differential Location Relative to Pre- and Postsynaptic Sites." *Neuroscience* 106 (3): 481–503.
- Taylor M. A., Abrams R. (1984). "Cognitive Impairment in Schizophrenia." *The American Journal of Psychiatry* 141 (2): 196–201.
- Tohen M., Stoll A. L., Strakowski S. M., Faedda G. L., Mayer P. V., Goodwin D. C., Kolbrener M. L., Madigan A. M. (1992). "The McLean First-Episode Psychosis Project: Six-Month Recovery and Recurrence Outcome." *Schizophrenia Bulletin* 18 (2): 273–82.
- Uehara T., Sumiyoshi T., Seo T., Itoh H., Matsuoka T., Suzuki M., Kurachi M. (2009). "Long-Term Effects of Neonatal MK-801 Treatment on Prepulse Inhibition in Young Adult Rats." *Psychopharmacology* 206 (4): 623–30.
- Uehara T., Sumiyoshi T., Seo T., Matsuoka T., Itoh H., Suzuki M., Kurachi M. (2010). "Neonatal Exposure to MK-801, an N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist, Enhances Methamphetamine-Induced Locomotion and Disrupts Sensorimotor Gating in Pre- and Postpubertal Rats." *Brain Research* 1352 (September): 223–30.
- Vales K., Bubenikova-Valesova V., Klement D., Stuchlik A. (2006). "Analysis of Sensitivity to MK-801 Treatment in a Novel Active Allothetic Place Avoidance Task and in the Working Memory Version of the Morris Water Maze Reveals Differences between Long-Evans and Wistar Rats." *Neuroscience Research* 55 (4): 383–88.
- van Os J., Selten J. P. (1998). "Prenatal Exposure to Maternal Stress and Subsequent Schizophrenia. The May 1940 Invasion of The Netherlands." *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science* 172 (April): 324–26.
- Vardi N., Duvoisin R., Wu G., Sterling P. (2000). "Localization of mGluR6 to Dendrites of ON Bipolar Cells in Primate Retina." *The Journal of Comparative Neurology* 423 (3): 402–12.
- Volk D. W., Austin M. C., Pierri J. N., Sampson A. R., Lewis D. A. (2000). "Decreased Glutamic Acid decarboxylase67 Messenger RNA Expression in a Subset of Prefrontal Cortical Gamma-Aminobutyric Acid Neurons in Subjects with Schizophrenia." *Archives of General Psychiatry* 57 (3): 237–45.
- Walf A. A., Frye C. A. (2007). "The Use of the Elevated plus Maze as an Assay of Anxiety-Related Behavior in Rodents." *Nature Protocols* 2 (2): 322–28.
- Walker E. F., Savoie T., Davis D. (1994). "Neuromotor Precursors of Schizophrenia." *Schizophrenia Bulletin* 20 (3): 441–51.
- Wang C., Showalter V. M., Hillman G. R., Johnson K. M. (1999). "Chronic Phencyclidine Increases NMDA Receptor NR1 Subunit mRNA in Rat Forebrain." *Journal of Neuroscience Research* 55 (6): 762–69.
- Wang C., McInnis J., Ross-Sanchez M., Shinnick-Gallagher P., Wiley J. L., Johnson K. M. (2001). "Long-Term Behavioral and Neurodegenerative Effects of Perinatal Phencyclidine Administration: Implications for Schizophrenia." *Neuroscience* 107 (4): 535–50.

- Wassef A., Baker J., Kochan L.D. (2003). "GABA and Schizophrenia: A Review of Basic Science and Clinical Studies." *Journal of Clinical Psychopharmacology* 23 (6): 601–40.
- Weinberger D. R. (1987). "Implications of Normal Brain Development for the Pathogenesis of Schizophrenia." *Archives of General Psychiatry* 44 (7): 660–69.
- Weinberger D. R. (1996). "On the Plausibility Of 'the Neurodevelopmental Hypothesis' of Schizophrenia." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 14 (3 Suppl): 1S–11S.
- Wesierska M., Dockery C., Fenton A. A. (2005). "Beyond Memory, Navigation, and Inhibition: Behavioral Evidence for Hippocampus-Dependent Cognitive Coordination in the Rat." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (9): 2413–19.
- Whishaw I. Q., Auer R. N. (1989). "Immediate and Long-Lasting Effects of MK-801 on Motor Activity, Spatial Navigation in a Swimming Pool and EEG in the Rat." *Psychopharmacology* 98 (4): 500–507.
- Wilson C., Kercher M., Quinn B., Murphy A., Fiegel C., McLaurin A. (2007). "Effects of Age and Sex on Ketamine-Induced Hyperactivity in Rats." *Physiology & Behavior* 91 (2–3): 202–7.
- Wilson M. A., Kinsman S. L., Johnston M. V. (1998). "Expression of NMDA Receptor Subunit mRNA after MK-801 Treatment in Neonatal Rats." *Brain Research. Developmental Brain Research* 109 (2): 211–20.
- Wong D. F., Wagner H. N., Tune L. E., Dannals R. F., Pearlson G. D., Links J. M., Tamminga C. A. (1986). "Positron Emission Tomography Reveals Elevated D2 Dopamine Receptors in Drug-Naive Schizophrenics." *Science (New York, N.Y.)* 234 (4783): 1558–63.
- Wong E.H., Kemp J. A., Priestley T., Knight A. R., Woodruff G. N., Iversen L. L. (1986). "The Anticonvulsant MK-801 Is a Potent N-Methyl-D-Aspartate Antagonist." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (18): 7104–8.
- Yonezawa Y., Kuroki T., Kawahara T., Tashiro N., Uchimura H. (1998). "Involvement of Gamma-Aminobutyric Acid Neurotransmission in Phencyclidine-Induced Dopamine Release in the Medial Prefrontal Cortex." *European Journal of Pharmacology* 341 (1): 45–56.
- Zajackowski W., Czyrak A., Wedzony K. (2003). "A Competitive Antagonist of NMDA Receptors CGP 40116 Attenuates Experimental Symptoms of Schizophrenia Evoked by MK-801." *Polish Journal of Pharmacology* 55 (5): 703–11.
- Zhang Z. J., Reynolds G. P. (2002). "A Selective Decrease in the Relative Density of Parvalbumin-Immunoreactive Neurons in the Hippocampus in Schizophrenia." *Schizophrenia Research* 55 (1–2): 1–10.
- Zuo D.-Y., Zhang Y.-H., Cao Y., Wu C.-F., Tanaka M., Wu Y.-L. (2006). "Effect of Acute and Chronic MK-801 Administration on Extracellular Glutamate and Ascorbic Acid Release in the Prefrontal Cortex of Freely Moving Mice on Line with Open-Field Behavior." *Life Sciences* 78 (19): 2172–78.